

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**ABA-toimeline õhulõhede regulatsioon teraviljadel ja osjadel**

Magistritöö

30 EAP

Egon Meigas

Juhendaja vanemteadur Ebe Merilo, PhD

TARTU 2020

# INFOLEHT

## **ABA-toimeline õhulõhede regulatsioon teraviljadel ja osjadel**

Stressihormoon abstsiihappe (ABA) üheks funktsiooniks on reguleerida õhulõhede, taimelehtedel asuvate väikeste pooride avatust, et tagada optimaalne transpiratsioon ja CO<sub>2</sub> omastamine muutuvates keskkonnatingimustes. Kliimamuutuse ja inimpopulatsiooni kasvu valguses on oluline uurida õhulõhede regulatsiooni põllumajanduslikult tähtsatel liikidel, eesmärgiga tõsta saaginumbreid ja vastupidamist stressile. Sellest lähtuvalt uuriti käesolevas töös üheksa odra- ja kahe maisisordi õhulõhede reaktsioone ABA-le. Lisaks uuriti õhulõhede aktiivset regulatsiooni evolutsiooniliselt vanadel liikidel, osjadel. Töös leiti, et odra ja maisi õhulõhed sulguvad ABA toimetel, sulgumise ulatus sõltus ABA kontsentratsioonist. Otrade puhul leiti ka väga suur varieeruvus ABA-vastuses. Samuti selgus, et osjadel puudub aktiivne ABA-toimeline regulatsioon, kuid CO<sub>2</sub> lisamisele nende õhulõhed reageerisid.

Märksõnad: õhulõhed, oder, mais, osi, abstsiihape

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia

## **ABA-mediated stomatal regulation in cereals and horsetails**

The aperture of stomata, small pores on the plant leaves, is regulated by the stress hormone abscisic acid (ABA) in order to optimise water loss and carbon assimilation in changing environmental conditions. In the light of climate change and rise in human population it is important to study stomatal regulation in agriculturally important species to understand the perspectives to increase yield and stress tolerance of crops. In the present study, stomatal ABA-induced regulation in nine barley and two maize cultivars was studied. Barley and maize stomata responded to ABA in a dose dependent manner: the higher the ABA concentration, the larger the stomatal closure. Stomatal ABA-sensitivity of barley genotypes was very found to be variable. Stomata of horsetails responded to elevated CO<sub>2</sub>, but not to exogenous ABA.

Keywords: stomata, barley, maize, horsetail, abscisic acid

CERCS: B310 Physiology of vascular plants

# SISUKORD

|   |    |
|---|----|
| INFOLEHT.....   | 2  |
| SISUKORD .....  | 3  |
| KASUTATUD LÜHENDID .....  | 4  |
| SISSEJUHATUS .....  | 6  |
| KIRJANDUSLIK TAUST .....  | 7  |
| 1.1 Põllumajanduslik olulisus .....                                   | 7  |
| 1.2 Õhulõhed ja nende regulatsioon .....                              | 8  |
| 1.2.1 Stressihormoon abstsiihape.....                                 | 10 |
| 1.2.2 ABA-toimeline õhulõhede sulgumine .....                         | 11 |
| 1.2.3 CO <sub>2</sub> -sõltuv õhulõhede sulgumine.....                | 13 |
| 1.2.4 Õhulõhede ja nende regulatsiooni evolutsioon.....               | 14 |
| 1.3 Osjad kui elavad fossiilid .....                                  | 15 |
| EKSPERIMENTAALOSA .....   | 17 |
| 2.1 Töö eesmärgid .....   | 17 |
| 2.2 Materjal ja metoodika.....  | 18 |
| 2.2.1 Taimede kasvatamine .....                                       | 18 |
| 2.2.2 Aparatuur .....   | 19 |
| 2.2.3 Katsete ülesehitus .....  | 20 |
| 2.2.4 Andmeanalüüs .....  | 21 |
| 2.3 Tulemused .....   | 22 |
| 2.3.1 Otrade basaalne õhulõhede juhtivus ning ABA-tundlikkus .....    | 22 |
| 2.3.2 Maisi õhulõhede ABA-toimeline reaktsioon.....                   | 26 |
| 2.3.3 Gaasivahetuskatsed kolme osja liigiga .....                     | 27 |
| 2.4 Arutelu.....  | 29 |
| 2.4.1 Otrade varieeruv ABA-tundlikkus .....                           | 29 |
| 2.4.2 Maisi õhulõhede ABA tundlikkus .....                            | 31 |
| 2.4.3 Osjade basaalne juhtivus ning õhulõhede puuduv ABA vastus ..... | 32 |
| 2.4.4 Üldised järeldused .....  | 35 |
| KOKKUVÕTE .....   | 36 |
| Resümee .....   | 37 |
| TÄNUAVALDUSED.....  | 39 |
| VIITED .....  | 40 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....  | 48 |
| LISAD .....   | 49 |
| LIHTLITSENTS.....   | 53 |

## KASUTATUD LÜHENDID

ABA – abstsiihape

Anet – netofotosüntees/fotosünteesi kiirus

gs – õhulõhede juhtivus

HT1 – HIGH LEAF TEMPERATURE 1

MPK12 – MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 12

MPK4 – MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 4

OST1 – OPEN STOMATA 1

SnRK2.6 – SUCROSE NON-FERMENTING 1 (SNF1)-RELATED KINASE 2-6

[CO<sub>2</sub>] – süsihappegaasi kontsentratsioon

PYR – PYRABACTIN RESISTANCE

PYL – PYR1-LIKE

RCAR – REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR

Rubisco – ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas

SLAC1 – SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1

H<sup>+</sup>-ATPaas – ATP energiat vaja prootonpump

(S)-cis-ABA – abstsiihappe S (-) enantiomeer

(R)-cis-ABA – abstsiihappe R (+) enantiomeer

ABA-GE – abstsiihappe glükosüülester

CYP707A – CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 4

PP2C – PROTEIN PHOSPHATASE 2C

ABI1 – ABA INSENSITIVE 1

HAB1 – ABA HYPERSENSITIVE 1

CPK – CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE

SLAH3 – SLAC1 HOMOLOGUE 3

QUAC1 – QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1

GORK1 – GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K<sup>+</sup> CHANNEL

PPFD – PHOTOSYNTHETIC PHOTON FLUX DENSITY ehk fotosünteesiliselt aktiivne kiirgus

HvSLAC1 – *Hordeum vulgare* SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1

TMD3 – TRANSMEMBRANE DOMAIN 3

HvDEP1 – *Hordeum vulgare* DENSE AND ERECT PANICLE 1

ZmOST1 – *Zea mays* OPEN STOMATA 1

## SISSEJUHATUS

Kliima on muutumas, süsihappegaasi kontsentratsioonid jätkuvalt tõusuteel ning koos sellega tõusmas ka globaalne keskmine temperatuur. Muutuvad ka sademete hulk ja periood ning seda piirkonniti väga erinevalt. Prognoose ja mudeleid kliimamuutuse mõju kohta teraviljade kasvatusele ja saagikusele järgmise 30 aasta jooksul on hulganisti ning nende tulemused varieeruvad (Xie *et al.*, 2018; Tao *et al.*, 2020). See aga on kindel, et globaalne rahvaarv kasvab, jõudes ennustuste kohaselt 9,7 miljardi inimeseni 2050. aastaks ning sellega koos suureneb ka nõudlus toidu järele (UN DESA, 2015).

Veekasutuse reguleerimiseks on maismaataimedel õhulõhed – mikroskoopilised poorid taimelehtede pinnal. Läbi õhulõhede siseneb lehte fotosünteesi tooraine süsihappegaas ja väljub veeaur, kusjuures selle gaasivahetuse kiirus sõltub õhulõhede avatusest. Optimaalse gaasivahetuse tagamiseks erinevates keskkonnatingimustes on taimedel välja arenenud võime reguleerida õhulõhede avatust. Taimede aktiivset vastust veepuudusele vahendab peamiselt stressihormoon abstsissihape (ABA), mis muuhulgas kutsub esile õhulõhede sulgumise, piirates seeläbi veekadu. See on teinud õhulõhed ja nende regulatsiooni perspektiivikaks uurimisobjektiks, eesmärgiga arendada välja põuakindlaid ja saagikamaid sorte.

Inimkonna toitmine baseerub suures mahus teraviljade, s.h maisi, riisi, nisu ja odra kasvatamisel. Paraku on teraviljad alaesindatud õhulõhede regulatsiooni uurimisel võrreldes mudeltaimede müürlaoga (*Arabidopsis thaliana*) ja arulustega (*Brachypodium distachyon*) (Brkljacic *et al.*, 2011). Mais (*Zea mays*) ja oder (*Hordeum vulgare* L.) on ühed olulisemad teraviljad inimkonna jaoks. Mõlemaid kasvatatakse peamiselt loomasöödaks, lisaks on oder õlle- ja viskitööstuse alustala. Oder on teraviljade seas väga paindlik oma kasvukeskkonna suhtes ning ka põuale vastupidav (López-Castañeda & Richards, 1994; Zhou, 2010). Põud ja kõrge temperatuur on peamisteks abiootilisteks stressoriteks taimedele (Leng & Hall, 2019).

Käesoleva töö eesmärgiks oli ainulaadse gaasivahetussüsteemiga uurida ja võrrelda õhulõhede vastuseid ABA-le kahel teraviljal – odral ja maisil. Mõlemad on veestressile vastupidavad liigid, aga oder on C<sub>3</sub>-fotosünteesi esindaja ning mais efektiivsema C<sub>4</sub>-fotosünteesi esindaja (Sage ja Zhu, 2011). Lisaks tehti antud töös esmakordselt gaasivahetuskatsed kolme osjaliigiga, selgitamaks nende evolutsiooniliselt iidsete taimede õhulõhede ABA-tundlikkuse olemasolu ning seega lisada omalt poolt andmeid õhulõhede ABA-st sõltuva regulatsiooni päritolu ja evolutsioonilise vanuse küsimusse.

Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi Taimesignaalide uurimisrühmas.

# KIRJANDUSLIK TAUST

## 1.1 Põllumajanduslik olulisus

Alates 1960. aastast on maailma keskmine teraviljade saagikus pea kolmekordistunud, kasvades 1,35 tonnilt ha<sup>-1</sup> 3,5 tonnini ha<sup>-1</sup>, samal ajal kui kultiveeritav maa-ala on suurenenud vaid 9% (Prohens, 2011). See on saavutatud suuresti agronoomiliste tehnoloogiate arengu ja sordiaretusega. Kuni 88% nisu, odra ja rapsi saagikuse tõusust omistatakse just sortide geneetilise täiustamise arvele (Mackay *et al.*, 2011).

Viimase 30 aasta lõikes on Euroopas teraviljade saagikus paraku stagneerunud. Soojemad kasvuperioodid on endaga kaasa toonud umbkaudselt 3,8%-lise saagilanguse odral ning Vahemeremaadesse ennustatakse aina suuremat terasaagikadu. Näiteks Itaalias on kõrgem temperatuur ja kuivem õhk põhjustanud juba hinnanguliselt 5%-lise saagilanguse (Moore ja Lobell, 2014; Moore ja Lobell, 2015).

Oder (*H. vulgare*) on üks esimesi inimese kodustatud teravilju ning hetkel on ta kogutoodangult neljas teravili maailmas, järgnedes maisile, riisile ja nisule. Rohkem kui kolmandik (58 miljonit tonni) globaalsest odrasaagist toodetakse Euroopa Liidus (Wendorf *et al.*, 1979; FAOSTAT, 2018). ÜRO andmetel läheb 70% sellest loomasöödaks, 21% linnaste ja muu alkoholi toodanguks ning 6% tarbitakse ära inimtoiduna. Samuti on ta üks kõige suurema geneetilise varieeruvusega teravilju ning seetõttu kasvatatakse otra subtroopikast arktikani välja (Zhou, 2010). Kuigi odra genoom on üsna pirakas – haploidse genoomi suurusega 5,3 Gb, on ta võrdlemisi lihtsa ülesehituse ja väikese kromosoomide hulgaga (2n=14, HH) (Harwood, 2019). Kuna oder on diploidne, teeb see temast ka suurepärase mudeli uurimaks keerukama genoomiga teravilju, milleks on näiteks harilik nisu oma heksaploidse genoomiga (2n=6x=42, AABBDD; Giraldo *et al.*, 2019; IWGSC, 2014).

Maisi (*Z. mays*) ajalugu inimeste toidulaua ulatub samuti mitmete tuhandete aastate taha (Piperno ja Flannery, 2001). Hetkel on mais ligi 1,15 miljardi tonnise aastase kogutoodanguga kõige enam kultiveeritav teravili maailmas (FAOSTAT, 2020). Aasias, Euroopas ja Ameerika Ühendriikides kasutatakse maisi põhiliselt loomasöödana, samas kui Aafrika riikides jõuab enamuse toidulauale (Patrick, 2011; Prasanna, 2013; Ranum *et al.*, 2014; Ekpa *et al.*, 2019). Maisist toodetakse ka biokütuseid, kusjuures Ameerika Ühendriikides moodustab see c.a 40% kogu maisi toodangust (Ranum *et al.*, 2014).

Maisi eristab teistest enim kultiveeritavatest teraviljadest tema efektiivsem süsihappegaasi (CO<sub>2</sub>) sidumise mehhanism, mida kutsutakse C<sub>4</sub>-fotosünteesiks. Teiste teraviljade, näiteks nagu riisi, nisu ja odra CO<sub>2</sub> fikseerimisega (C<sub>3</sub>-fotosüntees) võrreldes omab C<sub>4</sub>-fotosüntees

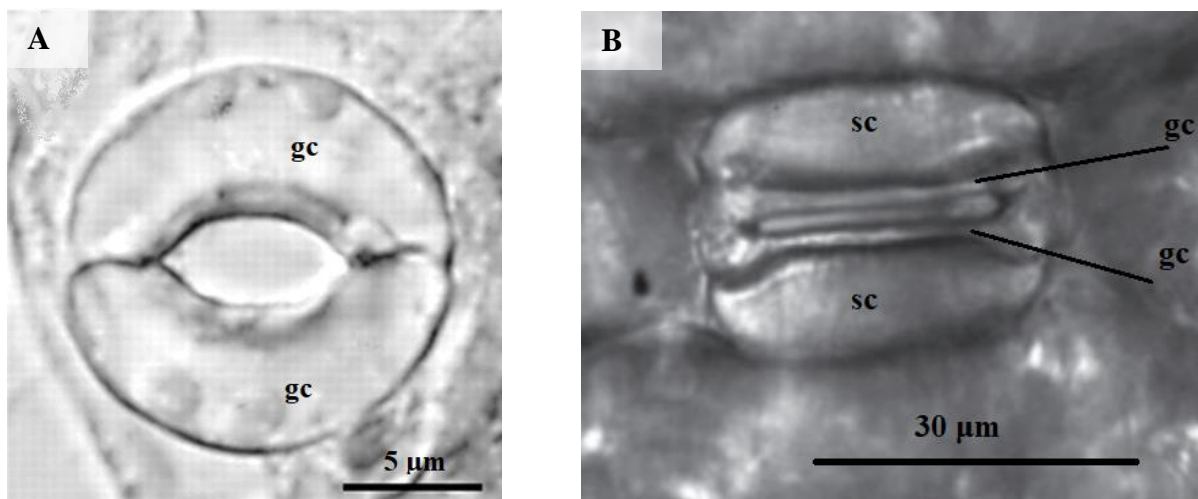
oluliselt kõrgemat fotosünteesilist efektiivsust, eriti troopilises keskkonnas, kus kõrge temperatuur ja vähene vee kättesaadavus indutseerivad C<sub>3</sub>-taimedes energeetiliselt raiskavat fotorespiratsiooni (Brutnell *et al.*, 2010; Gowik ja Westhoff, 2011). C<sub>3</sub>-taimedes toimub Calvini tsüklil ehk CO<sub>2</sub> fikseerimine mesofüllil rakkudes, seda limiteerivad ühelt poolt CO<sub>2</sub> difusioon rakku ning teisalt hapniku (O<sub>2</sub>) seondumine Calvini tsükli võtmeensüüm Rubisco-le (fotorespiratsioon; Reichle, 2020). C<sub>4</sub>-fotosüntees on jagatud kahe rakutüübi, mesofüllil ja kimbuümbrise rakkude vahel, kus esimesed seovad CO<sub>2</sub> ajutiselt ja transpordivad vaheühendite näol edasi Calvini tsükli toimumiskohta kimbuümbrise rakkudesse. Nõnda suudavad C<sub>4</sub>-taimed märkimisväärselt tõsta CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni Rubisco ümber ja vähendada fotorespiratsiooni (Gowik ja Westhoff, 2011). Efektiivsema süsiniku sidumise tõttu saavad C<sub>4</sub>-taimed võrreldes C<sub>3</sub>-taimedega hoida õhulõhesid rohkem suletuna, seega vähendada ka veekadu ning oluliselt tõsta vee-kasutuse efektiivsust (Long, 1998; Hamim, 2005; Way *et al.*, 2014; Meigas, bakalaureusetöö, 2017).

Mais ja oder on teiste tähtsate teraviljadega võrreldes oluliselt vastupidavamad abiootilistele stressoritele, s.h põuale. Odral on geograafiliselt suur areaal kultiveeritavatel ja metsikutel tüvedel täiustanud ja mitmekesistanud geneetilist tausta ning kohastumusi, samas kui maisil tuleneb vastupidavus suuresti tema C<sub>4</sub> süsiniku fikseerimisest ja sellega kaasnevast madalamast transpiratsioonist (Gowik ja Westhoff, 2011; Newton *et al.*, 2011; Saade *et al.*, 2018).

## 1.2 Õhulõhed ja nende regulatsioon

Õhulõhed on imepisikesed avaused taimelehtedel, mis võimaldavad välisõhust omastada süsihappegaasi ning transpireerida ümbritsevasse õhku veeauru. Transpiratsioon aitab reguleerida lehe temperatuuri ja tõmmata mullast toitaineid. Õhulõhed esinevad soontaimedel, sh. ka osjadel ja sõnajalgadel ning ka mõningatel primitiivsematel taimedel, näiteks sammaldel (Brownlee, 2018). Õhulõhe moodustub kahest sulgrakust, mille vahele jääb õhupilu. Kaheiduleheliste taimede sulgrakud on tüüpiliselt neeru-kujulised (Joonis 1A). Kõrrelistel on nad aga hantli-kujulised ning neid toetavad kummaltki poolt veel kaasrakud (Joonis 1B). Tänu kaasrakkudele on kõrreliste õhulõhede reaktsioonid abiootilistele keskkonnafaktoritele kiiremad kui teistel taimedel (Franks ja Farquhar, 2007; Kirkham, 2014; Merilo *et al.*, 2014).





Joonis 1. Valgusmikroskoobi pildid: (A) kaheidulehelise taime müürlooga (*A. thaliana*) õhulõhest (Tanaka *et al.*, 2005). Joonisel on näha neeru-kujulised sulgrakud (gc) ja nende vahele moodustuv poor; (B) odra (*H. vulgare*) ehk kõrrelise õhulõhest (Koers *et al.*, 2011). Joonisel on näha kaasrakud (sc), hantli kujulised sulgrakud (gc) ja nende vahele jääv õhupilu. Originaaljooniseid on muudetud.

Õhupilu laius määrab, kui palju CO<sub>2</sub> lehe siseruumi siseneb ning kui palju vett ja hapnikku samal ajal taimest väljub. Õhupilu suuruse muutmisel tuleb mängu sulgrakkude anatoomia – neil on membraanis jäigemad (seesmine) ja elastsemad (selgmine) alad ning tõstes või langetades sulgraku turgorit õhupilu vastavalt kas suureneb või kahaneb (Marom *et al.*, 2017). Neerukujulistel sulgrakkudel toimub turgori muutumine ionide liikumisega sulgrakkude ja ümbritseva apoplasti vahel, kõrrelistel aga ionide liikumisega sulgrakkude ja kaasrakkude vahel (Kirkham, 2014; Merilo *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2020).

Õhulõhede aktiivne regulatsioon on taimedel välja arenenud, et reageerida muutustele ümbritsevas keskkonnas: niimoodi tagab taim optimaalse tasakaalu CO<sub>2</sub> omastamise ja transpiratsiooni vahel. Seetõttu avanevad õhulõhed CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni ([CO<sub>2</sub>]) langedes ja valguse toimel ning sulguvad madala õhuniiskusega, veepuuduses, pimeduses ja [CO<sub>2</sub>] tõustes (Shimazaki *et al.*, 2007; Aoki *et al.*, 2019). Õhulõhede sulgumine veepuuduses on põhjustatud üleüldisest turgori vähenemisest, kuid toimub teisalt ka stressihormoonide, milleks peamiselt on abstsissihape (ABA), vahendusel (Munemasa *et al.*, 2015).

Õhulõhede avanemine algab prootonite väljapumpamisega sulgrakust H<sup>+</sup>-ATPaasi poolt, mis hüperpolariseerib rakumembraani ning omakorda põhjustab K<sup>+</sup>-ioonide sissevoolu sulgrakku. Koos K<sup>+</sup> ionidega sisenevad rakku anioonid ning neile järgneb läbi akvaporiniinide vesi – see tõstab sulgraku turgorit ning õhupilu nende vahel laieneb (Cominelli *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010).

Õhulõhede sulgumisel seevastu inhibeeritakse  $H^+$ -ATPaas ning aktiveeritakse  $Ca^{2+}$ -ioonkanalid, mis pumpavad  $Ca^{2+}$  ioone rakku. Lisaks aktiveeruvad kiired (R-tüüpi) ja aeglased (S-tüüpi) anioonkanalid, transportides rakust välja malaadi<sup>2-</sup>,  $Cl^-$  ja  $NO_3^-$  ioone, seeläbi depolariseerides sulgraku membraani.  $K^+$  ionid liiguvad rakust välja ning taaskord järgneb ionidele vesi, langetades sulgraku turgorit ning sulgedes õhulõhe (Kim *et al.*, 2010; Kollist *et al.*, 2014).

### 1.2.1 Stressihormoon abstsissiisshape

ABA isoleeriti ja identifitseeriti juba 1960-datel. Tema isomeere (S)-*cis*-ABA ja (R) -*cis*-ABA peetakse mõlemaid bioloogiliselt aktiivseks, kuid (S)-*cis*-ABA-l on tugevam mõju kiireloomulistes reaktsioonides, s.h õhulõhede sulgumisel (Cutler *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017). ABA-l on tähtis roll erinevate protsesside reguleerimisel kogu taime elutsükli jooksul – ABA on oluline komponent nii idanemise, varajase kasvu, stressivastuste, juurte kasvu, seemnete valmimise, õhulõhede reaktsioonide, patogeenvastuste ja vananemise reguleerimisel (Finkelstein, 2013; Li *et al.*, 2017).

ABA sünteesitakse pea kõikides taimerakkudes, mis sisaldavad kloroplaste või amüloplaste ning ABA sünteesiraja põhikomponendid on konserveerunud kõikides maismaataimedes. ABA leidub ka teistes elusorganismides, bakteritest inimeseni välja, aga neis pole tal süsteemselt olulist rolli (Li *et al.*, 2017). ABA biosüntees taimedes on mitmeetapiline ja algab kloroplastides või teistes plastiidides. Beeta-karoteenist saadakse hüdroksülaasi toimel zeaksantiin, mis ensümaatiliselt konverteeritakse ridamisi erinevateks ksantiinideks, millest lõpuks tsütosoolis sünteesitakse ABA (Nambara and Marion-Poll, 2005).

Arvatakse, et õhulõhede regulatsioonis osalev ABA võib taimes pärineda mitmest eri kohast. *A. thaliana* peal on näidatud, et oluline on lehtedes, floemi kastrakkudes, kus stressivastusena tõuseb ABA sünteesiga seotud geenide ekspressioon, sünteesitud ABA (Kuromori *et al.*, 2014). Uuemad katsed on näidanud, et mesofüllirakud on erinevatel taimeliikidel veestressis peamine ABA sünteesi asukoht (McAdam ja Brodribb, 2018). Lisaks on näidatud, et ka sulgrakkudes endis toodetud ABA on piisav reguleerimaks õhulõhede avatust, st. ka neis on kogu ABA sünteesirada ekspresseeritud ning kõrgema aktiivsusega madala õhuniiskuse juures (Bauer *et al.*, 2013; Merilo *et al.*, 2018; Cotellet ja Leonhardt, 2019)

ABA on kergelt happeline ( $pK_a=4,7$ ) ja ta on võimeline tänu erinevustele apoplasti ja tsütoplasma pH-s ka difusiooni teel rakkudesse sisenema (Boursiac *et al.*, 2013). Kuid kuna ABA on tsentraalselt oluline hormoon ja stressitingimustes apoplasti pH tõusu tõttu ABA

difusioon rakkudesse langeb, on tema transport aktiivselt reguleeritud (Kang *et al.*, 2010; Boursiac *et al.*, 2013; Kuromori *et al.*, 2018; Cotellet ja Leonhardt, 2019). *A. thaliana*-l on tuvastatud ABA impordi ja ekspordi transportereid ja nende ekspressioon kudedes viitab sellele, et ABA transporditakse juhtkudedest õhulõhedesse (Kang *et al.*, 2010; Kuromori *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017). Samas on leitud, et transporterite *knock-out* mutandid ei sarnane fenotüübilt ABA sünteesi mutantidega, mis tähendab, et aktiivne ABA transport on keerukam protsess, kui praeguseks teada on (Cotellet ja Leonhardt, 2019).

ABA kontsentratsiooni rakus määrab lisaks *de novo* sünteesile ja transpordile ka tema katabolism, hoiustamine inaktiivse ABA-glükosüülestri vormis (ABA-GE) ning ABA-GE hüdrolyüs beeta-glükosidaasiga aktiivse ABA taastootmiseks (Xu *et al.*, 2012). ABA lagundamine toimub peamiselt CYP707A perekonna tsütokroom P450 monooksügenaaside toimel, mille käigus tekib ABA-st faseinhape (Cutler ja Krochko, 1999; Li *et al.*, 2017).

ABA ja tema signaaliraja komponente on juba kaua peetud perspektiivikateks sihtmärkideks uute ja tõhusamate sortide väljaaretamisel, peamiselt seoses ABA rolliga veekasutuse regulatsioonis (Dejonghe ja Cutler, 2019; Vaidya *et al.*, 2019). Näiteks nisul (*T. aestivum*) on saavutatud ABA retseptori (PYL4) üleekspressiooniga märkimisväärne põuataluvuse tõus (Mega *et al.*, 2019). Kuna ABA reguleerib stressivastust, siis kaasneb ABA või tema signaaliraja komponentide robustse üleekspressiooniga sageli negatiivne mõju saagikusele või kasvule normaaltingimustel, aga seda ülalmainitud nisu mutantides ei juhtunud (Dejonghe ja Cutler, 2019; Mega *et al.*, 2019).

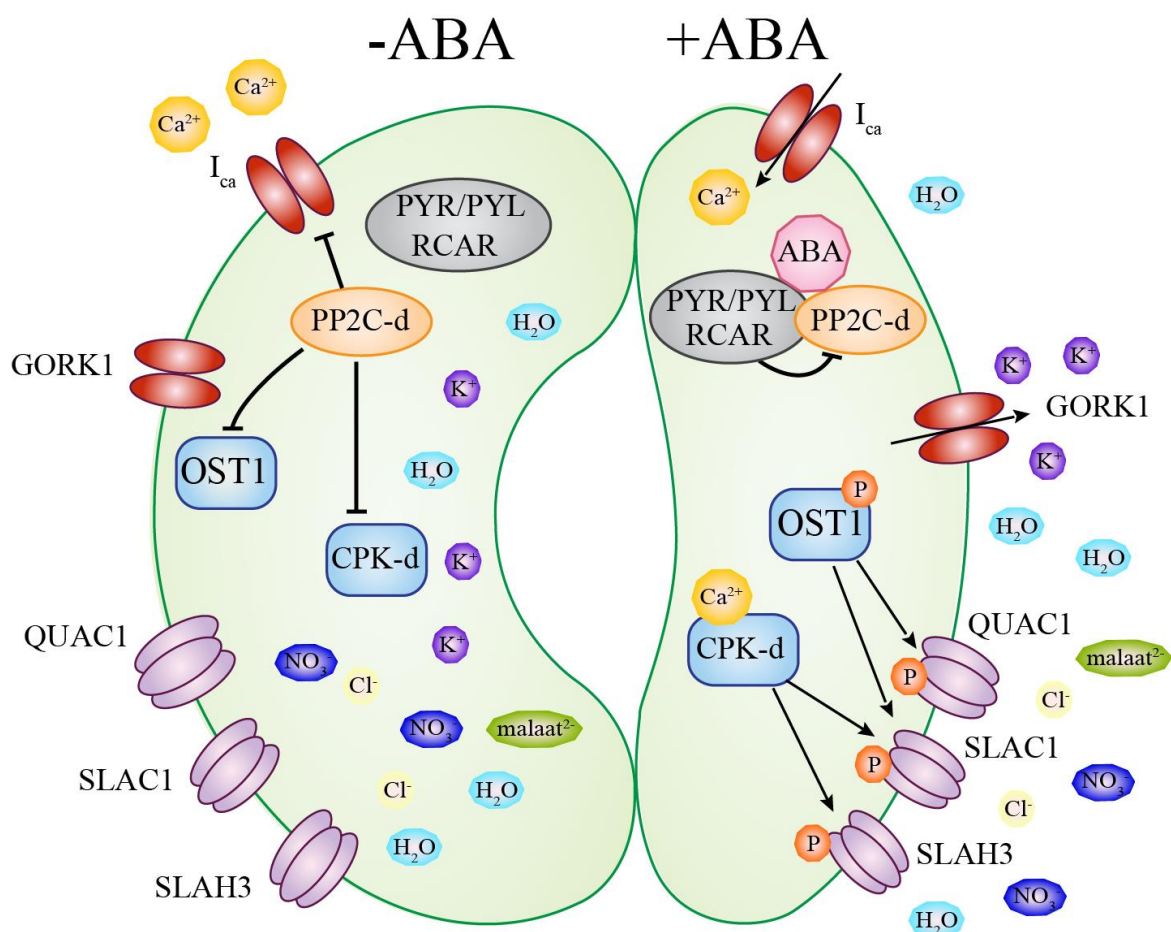
### **1.2.2 ABA-toimeline õhulõhede sulgumine**

ABA toimeline õhulõhede sulgumine saavutatakse läbi mitme-etapilise signaaliraja, mille esimeseks lüliks on ABA PYR/PYL/RCAR retseptorvalgud (PYRABACTIN RESISTANCE1/PYR1-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Raghavendra *et al.*, 2010). Neid on *A. thaliana*-s tuvastatud kokku 14 ning oma biokeemialt jagunevad nad kahte gruppi - ühed moodustavad dimeere (PYR1, PYL1 ja PYL2) ja on madalama afiinsusega ABA suhtes ning teised toimivad monomeeridena (nt. PYL5, PYL6 ja PYL8) (Joshi-Saha *et al.*, 2011; Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012). Funktsionaalne rollijaotus retseptorite vahel on veel üsna ebaselge. Katsed mutantidega, milles viis ABA retseptorit kõigepealt kõrvaldati ning seejärel ükshaaval ainult sulgrakkudes taastati, näitasid, et ABA-st sõltuva sulgumise jaoks on vajalik peamiselt PYL2 olemasolu ning vähesel määral ka PYR1 (Dittrich *et al.*, 2019).

Õhulõhede sulgumiseks on vaja, et lisaks ABA-le ja tema retseptorile seonduks moodustuvasse kolmikkompleksi ka mõni TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASE (PP2C) perekonna fosfataas, seeläbi inaktiveerides PP2C-d (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012). PP2C fosfataase on *A. thaliana*-s enam kui 50, kuid õhulõhede regulatsioonis on olulised just ABI1 (ABA INSENSITIVE 1), ABI2 (ABA INSENSITIVE 2) ja HAB1 (HYPERSENSITIVE TO ABA 1) (Ma *et al.*, 2009). PP2C fosfataasid on aktiivsed, kui nad pole kolmikkompleksis ABA ja tema retseptoritega ning nende roll õhulõhede regulatsioonis on defosforüleerida ja seeläbi inaktiveerida kinaasi OST1/SnRK2.6 (OPEN STOMATA 1/ SUCROSE NONFERMENTING 1-RELATED PROTEIN KINASE 2-6).

OST1 kinaas on sulgrakkudes oluline ABA signaaliülekanne positiivne regulaator, mis fosforüleerib ja aktiveerib S-tüüpi SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL 1) ja R-tüüpi QUAC1 (QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL1) anioonkanaleid (Kollist *et al.*, 2014). Peale OST1 on sulgrakus veel ka CPK (CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE) kinaasid, mis on samuti võimelised SLAC1, kuid ka teisi S-tüüpi anioonkanaleid nagu SLAH3 (SLAC HOMOLOGUE 3) aktiveerima (Geiger *et al.*, 2011). CPK kinaaside aktiivsuseks on vajalik vabade  $\text{Ca}^{2+}$  ionide olemasolu, mis saavutatakse siis, kui sulgumise kaskaad on juba alanud.

Neutraalses, vabas olekus PP2C-d defosforüleerivad OST1 ja CPK kinaase ning anioonkanalid ei aktiveeru. ABA-PYR/PYL/RCAR-PP2C kolmikkompleksi moodustumisel PP2C fosfataasid enam defosforüleerimist läbi viia ei saa ning OST1 aktiveerub autofosforülatsiooni käigus, aktiveerides omakorda anioonkanalid, mille tulemusena algab anioonide ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , malaat<sup>-2</sup>) transport rakust välja. Vabade  $\text{Ca}^{2+}$  ionide tõus tsütoplasmas  $\text{Ca}^{2+}$ -ioone transportivate ionikanalite aktivatsiooni tõttu aktiveerib koos PP2C fosfataaside inhibeeriva rolli kadumisega ka CPK kinaasid. See omakorda toetab anioonkanalite aktivatsiooni ja rakumembraani depolarisatsiooni (Geiger *et al.*, 2011; Kollist *et al.*, 2014). Depolarisatsioon paneb  $\text{K}^+$  ionid liikuma rakust välja läbi GORK1 (GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING  $\text{K}^+$  CHANNEL) kanali ning selle massilise ionide väljutamisega sulgraku osmootiline potentiaal langeb, rakkudest väljub vesi ja õhulõhe sulgub (Munemasa *et al.*, 2015).



Joonis 2. ABA-toimelise õhulõhede sulgumise lihtsustatud skeem (koostatud Munemasa *et al.*, (2015) ja Jalakas (2019) jooniste põhjal). ABA puudumisel (**-ABA**; vasakpoolne sulgrakk) inhibeerivad PP2C fosfataasid OST1, CPK-d ja kaltsium kanaleid ning ionide transporti rakust välja ei toimu. ABA olemasolu korral (**+ABA**; parempoolne sulgrakk) moodustub ABA-PYL/PYR/RCAR-PP2C kolmikkompleks ning PP2C inhibitsioon OST1, CPK kinaasidele ja  $\text{Ca}^{2+}$  transporteritele kaob. Kinaaside OST1 ja CPK-de aktivatsioon (PP2C inhibitsiooni kadumise ja tsütoplasma  $[\text{Ca}^{2+}]$  tõusu teel) võimaldab anioonkanalite (SLAC1, QUAC1, SLAH3) aktiveerimist fosforüleerimisega. Algab anioonide ( $\text{malaat}^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  ja  $\text{NO}_3^-$ ) transport rakust välja, mis viib rakumembraani depolariseerimiseni. Seejärel väljuvad sulgrakust läbi GORK1 kanali  $\text{K}^+$  ionid, neile järgneb vesi ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Sulgraku turgor langeb ja õhulõhe sulgub.

### 1.2.3 $\text{CO}_2$ -sõltuv õhulõhede sulgumine

Lisaks ABA-le osaleb õhulõhede regulatsioonis ka atmosfääri  $\text{CO}_2$  kontsentratsioon, mis määrab lehesisese  $[\text{CO}_2]$ . Õhulõhedega omastatud süsihappegaas siseneb sulgrakku läbi akvaporiniide, mis omakorda interakteeruvad karboonhappe anhüdraasidega, muutes  $\text{CO}_2$  bikarbonaadiks ( $\text{HCO}_3^-$ ; Hu *et al.*, 2010). Kuigi mehhanism, kuidas kõrgeenenud bikarbonaadi tase signaali järgmistele komponentidele edastab, on veel täielikult täpsustamata, on siiski teada, et olulised valgud on kinaas HT1 (HIGH LEAF TEMPERATURE 1) ning teda

inhibeerivad kinaasid MPK4 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4) ja MPK12 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 12).  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  kontsentratsiooni tõustes tõuseb MPK4 ja MPK12 kinaaside aktiivsus, mille tulemusel HT1 kinaas inaktiveerub. HT1 ise inhibeerib anioonkanalit SLAC1 ja võimalik, et ka teisi ABA signaaliraja positiivseid komponente, näiteks kinaas OST1 (Hõrak *et al.*, 2016; Tõldsepp *et al.*, 2018). Kõrge  $\text{CO}_2$  toimel HT1 inaktiveerub, temapoolne otsene või kaudne SLAC1 inhibitsioon kaob ning käivitub õhulõhe sulgumine.

ABA ja  $\text{CO}_2$  signalisatsiooni võimalik kattumine on olnud õhulõhede regulatsiooni uurimisel oluline küsimus juba aastakümneid. Viimased andmed näitavad, et ehkki  $\text{CO}_2$  signaalirada vajab toimimiseks ABA signaaliraja olemasolu ning OST1 basaalselt aktiivust sulgrakkudes, siis  $\text{CO}_2$ -toimelist ABA sünteesi tõusu ja OST1 aktivatsiooni kõrge  $\text{CO}_2$  mõjul ei toimu (Zhang *et al.*, 2020).

#### 1.2.4 Õhulõhede ja nende regulatsiooni evolutsioon

Fotosünteesivatest elusorganismidest esineb ABA juba vetikates, samas kui poorid taimede pinnale ilmusid fossiilsete andmete põhjal 400 miljonit aastat tagasi maad koloniseerivatel helvik- ja kõdersammaldel (Chater *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019). Kuigi vetikate genoomis enamjaolt puuduvad PYR/PYL ABA retseptorid, on hiljuti tuvastatud *Zygnema circumcarinatum*-i ja ka teiste vetikaliikide genoomis ABA retseptorite analooge (Sun *et al.*, 2019). Samuti on vetikate genoomis leitud ortolooge ka PP2C fosfataasidele ja SnRK kinaasidele (de Vries *et al.*, 2018). Vetikate PYR/PYL valgud ei toimi klassikaliste ABA retseptoritena, vaid inaktiveerivad PP2C fosfataase ABA-st sõltumatult. Seetõttu arvatakse, et alles maa koloniseerimisel omandas taimedes ABA rolli stressivastuse reguleerijana ning see toimis läbi ABA-sõltuva PP2C-SnRK2 signaalkaskaadi peenhäälestamise (Sun *et al.*, 2019).

Geenide homolooge, mis katteseemnetaimedel vastutavad õhulõhede diferentseerumise ja epidermaalse paigutumise eest, leidub juba sammaltaimedel (Caine *et al.*, 2016; Chater *et al.*, 2017). Erandiks on helviksammal *Marchantia polymorpha*, tema gaasivahetust vahendav poor pole klassikalises mõttes õhulõhe, selle diferentseerumist vahendavad teised, teiste taimede õhulõhedega mitte seotud geenid (Ishizaki *et al.*, 2013; Chater *et al.*, 2017). Mõningatel sammaltaimedel on leitud ABA- ja  $\text{CO}_2$ -toimelist õhulõhede regulatsiooni ja SLAC1 anioonkanali aktivatsiooni (Lind *et al.*, 2015). Andmed sammaldest kõrgemate, varaste soontaimedega (sõnajalgade ja koldtaimedega) on vastukäivad. McAdam ja Brodribb (2012) ei tuvastanud ühelgi sõnajala ja koldtaime liigil ABA toimet õhulõhedele ning pidasid nende õhulõhede regulatsiooni hüdropassiivseks. Kuid näidatud on ka vastupidist: ABA-

toimelist õhulõhede sulgumist mitme sõnajalaliigi peal, ehkki need sulgumised on võrreldes katteseemnetaimedega väikesed (Cai *et al.*, 2017; Hõrak *et al.*, 2017).

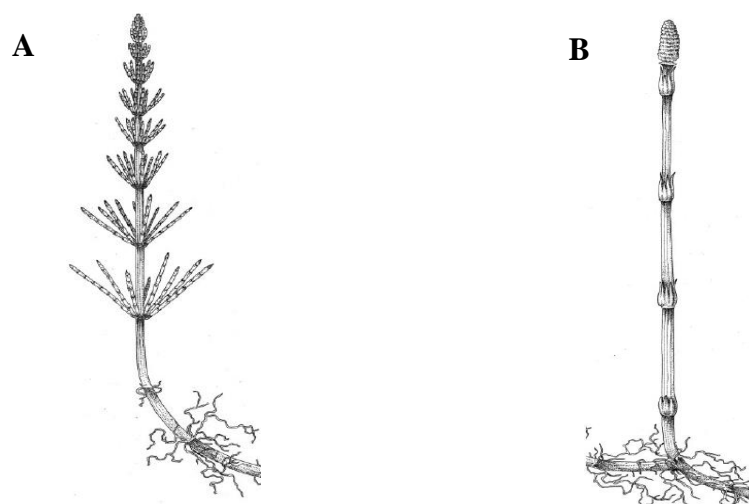
Katteseemnetaimedes on ABA õhulõhede regulatsioonis väga oluline komponent, võimaldades kiireid reaktsioone muutuvatele keskkonnatingimustele. Suur osa meie teadmisi õhulõhede regulatsiooni vallas pärineb tööstest hariliku müürloogaga (*A. thaliana*; McAdam ja Sussemilch, 2020).

### 1.3 Osjad kui elavad fossiilid

Osjad (perekond *Equisetum*) on sõnajalgtaimede hõimkonda, osjaliste sugukonda kuuluvad mitmeaastased rohhtaimed. Nad on ainsad ellujäänud *Sphenopsida* klaadi esindajad, mille ajalugu ulatub Hilis-Devoni (375-360 MAT) perioodini välja (Elgorriaga *et al.*, 2018). Osjad on püsinud suuremas jaos muutumatuna üle 300 miljoni aasta ning praeguseks on neid tuvastatud 15 liiki (Vanneste *et al.*, 2015; Michael, 2016). Osjade genoom on taimeriigis üks suuremaid. Neil on tuvastatud varases arengus kogu genoomi duplikatsioone (Clark *et al.*, 2019), mistõttu on pea kõikidel osjaliikidel diploidne genoom 216 kromosoomi (Bennert *et al.*, 2005). Ühegi osjaliigi täisgenoomi pole praeguse seisuga veel sekveneeritud ning andmeid üksikute geenijärjestuste kohta on väga vähe (Vanneste *et al.*, 2015).

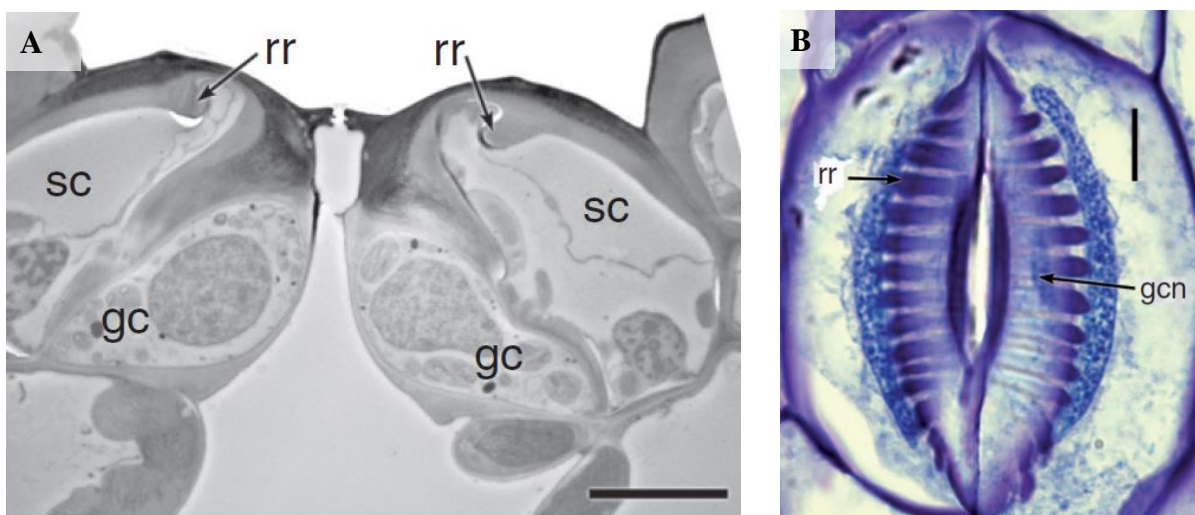
Osja maapealse osa moodustab püstine vars, millest kasvavad männastena välja lehed. Lehed on neil piklikud ning sõltuvalt liigist võivad olla harulised (Joonis 3A). Troopilised liigid võivad kasvada kuni 8 meetri kõrgusteks; parasvöötme liikidest näiteks põldosjad kasvavad kuni 40 cm kõrguseks. Osjad moodustavad maa-aluse risoomi, põldosjadel ulatub see üle 2 meetri sügavusele ning see võib neil olla mitmes tasapinnas (Husby, 2013). Risoomiga elavad mõned liigid ületalve, kasvatades kevadel sellest uued võrsed.

Osjad on eostaimed nagu sõnajaladki. Kevadel moodustavad nad lehtedeta võrseid, mille tippu moodustub eospea (Joonis 3B). Kui eosed on valminud, võrse hävib ning risoomist kasvavad uued, lehtedega võrsed (Merryweather, 2020). Samas võivad nad paljuneda ja levida ka vegetatiivselt, kui uus taim tekib eraldunud risoomi tükist või maapealsest osast. Seda paljunemisviisi kasutab eelistatult näiteks umbrohu staatuse saanud põldosi (Husby, 2013).



Joonis 3. Illustratsioon osja maapealsetest võsudest (Tomescu *et al.*, 2017). **(A)** Klassikaline assimileeriva osja morfoloogia – püstine vars, tasemeliselt männastena kasvavad lehed. **(B)** Eospea moodustanud, ilma männaslehtedeta osi. Originaaljoonist on muudetud

Osjade õhulõhed eristuvad oma morfoloogialt selgesti neist taimedest, millel sulgrakud üksi moodustavad õhupilu. Sarnaselt kõrreliste on osjadel kaasrakud, kuid sulgrakkude ümbritsemise asemel paiknevad need sulgrakkude peal (Joonis 4A). Osjade kaasrakke iseloomustab räniühenditest moodustunud ribiline struktuur (Joonis 4B), mille eesmärk pole veel päris selgeks tehtud, kuid arvatakse, et nende abil taim kasvu vältel sulgeb õhupilu ja fikseerib ta sellesse asendisse, et vähendada veekadu (Dayanandan & Kaufman, 1973; Cullen & Rudall, 2016).



Joonis 4. Osja *E. myriochaetum* õhulõhed (Cullen & Rudall, 2016). **(A)** Läbivkiirguse elektronmikroskoobi pilt *E. myriochaetum* õhulõhede ristlõikest (**rr** – räni ribid; **sc** – kaasrakud; **gc** – sulgrakud). Referentsskaala pikkus 10 µm. **(B)** Valgusmikroskoobi pilt *E. myriochaetum* õhulõhest pealtvaates, illustreerimaks ribilisi ränideposiite. (**rr** – räni ribid; **gcn** – sulgraku tuum). Referentsskaala pikkus 10 µm. Originaaljoonist on muudetud.



## EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Õhulõhede ja läbi nende toimuva gaasivahetuse regulatsioon teraviljadel on aina enam tähelepanu saav uurimisvaldkond muutuva kliima tõttu. Valdav osa meie teadmistest taimede õhulõhede regulatsiooni kohta pärineb siiski katsetest mudeltaimedega (*A. thaliana*, *B. distachyon*, *N. benthamiana* jt.), mitte põllumajanduslikult oluliste liikidega. Sellest tulenevalt alustasin juba bakalaureusetöös teraviljade gaasivahetuse uurimisega, teema jätkus magistritöös.

Käesoleva töö eesmärgiks on

- uurida ja võrrelda erinevate odrasortide gaasivahetust (õhulõhede juhtivust ja fotosünteesi kiirust) ja selle muutumist vastusena erinevatele ABA kontsentratsioonidele
- uurida, kas maisi õhulõhed reageerivad ABA-le ja kui, siis millisele ABA kontsentratsioonile.
- uurida õhulõhede aktiivset ABA- ja CO<sub>2</sub>-toimelist regulatsiooni osjadel, evolutsiooniliselt iidsetel liikidel.

Esialgse juhendaja Ebe Merilo tehtud otrade õhulõhede sulgumise katsed madala ABA kontsentratsiooniga (5 µM) näitasid otrade õhulõhede suhtelist ABA-tundetust (andmed pole esitatud). See sai minu magistritöö odrakatsete, kus lisandusid kõrgemad ABA kontsentratsioonid ja kaks uut sorti, lähtepunktiks.

## 2.2 Materjal ja metoodika

### 2.2.1 Taimede kasvatamine

Katsete jaoks kasvasin:

1) suviotra, kokku 9 sorti: Grace, Iron, Tipple, Breustar, Propino, Conchita, Quench, Barke ja Golden Promise.

2) maisi, kaks sorti: Richard ja Severus.

3) osjasid, kolm liiki: põldosi (*E. arvense*), päritolu Tartu (58°20'16.8"N 26°43'04.4"E); metsosi (*E. sylvaticum*), päritolu Jõgehara (57°56'34.5"N 26°40'01.2"E); aasosi (*E. pratense*), päritolu Tartu (58°23'39.0"N 26°40'52.1"E). Põldosjad kasvasid aiaumbrohuna peenras, metsosjad valgusküllastes tingimustes männimetsa serval ja aasosjad varjulisemas noores segametsas.

Odra ja maisi seemneid idandasin esmalt 3-5 päeva märja salvrätiku vahel petri tassidel, misjärel külvasin idanema läinud seemned 1L pottidesse – kaks taime poti kohta. Osjad kaevati loodusest koos pinnalähedase juurestikuga c.a 5-10 cm sügavuselt ning istutati laboris ümber 1L pottidesse. Kasvustraat pottides koosnes mahupõhiselt 4:2:3 osades turbast, vermikuliidist ning veest. Odrad ja osjad kasvasid kasvukambris (Percival, AR-66LX) ööpäeval režiimil 12h/12h valgust/pimedust, temperatuuriga vastavalt 23°C/18°C ning fotosünteesiliselt aktiivse kiirgusega (PPFD) 300/0  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Õhuniiskuse sihtmärkväärtus oli nii päeval kui öösel 70%. Mais kasvas kasvutoas sarnaselt teistele töös kasvatatud taimedele 12h/12h valgusrežiimil, aga PPFD oli päeval ajal 300-400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ning temperatuur ja suhteline õhuniiskus ööpäevaringselt vastavalt 23-24 °C ja 50-60%. Taimi hoiti kasvamise ajal hästi kastetuna. Maisiga mõõtsin gaasivahetust kahe kuni kolme lehe staadiumis c.a 10 päevaste taimedega ning odraga kahe kuni kolme lehe staadiumis umbes 14 päevaste taimedega. Osjadega tegin katsed alles kasvukambri tingimustes risoomist võrsunud taimedega.

### 2.2.2 Aparatuur

Katsed teostasin neljakambrilise termostateeritud gaasivahetusaparatuuriga, mille mõõtekambrites saab hoida konstantset õhutemperatuuri, õhuniiskust,  $[\text{CO}_2]$  ning valgusintensiivsust, võimalusega kõiki neid faktoreid katse käigus vastavalt katseplaanile ka muuta. Fotosünteesi ja transpiratsiooni arvutamiseks on vaja mõõta kambris siseneva ja kambrist väljuva õhu  $\text{CO}_2$  ja  $\text{H}_2\text{O}$  kontsentratsioone ning antud gaasivahetussüsteem teostab neid mõõtmisi korraga neljal taimel nii, et iga üksiku taime andmepunktid saadakse 8-minutilise intervalliga (Hõrak jt, 2017).

Mõõtekamber koosneb kahekordse seinaga klaaskuplist, sisemise diameetriga 10,6 cm ja kõrgusega 15,6 cm ning alusklaasist, millest üks pool on eemaldatav (Lisa 1). Kupli klaasseinte vahel on termostateeritud veesein, mis hoiab kogu katse vältel konstantset temperatuuri. Fikseeritud alusklaasil asuvad õhu sisse- ja väljavooluavad, ventilaator õhu ühtlaseks segamiseks ning temperatuuri sensor. Eemaldataval alusklaasil on ühes servas süvendus, mille abil paigutub taim kambris ning mis tuleb plastiliiniga tihendada kambri hermeetilisuse saavutamiseks. Süsteem töötab kerge ülerõhu all, et vältida toaõhu sattumist mõõtevoolikutesse. Õhk süsteemi pumbatakse õuest läbi 25L klaasanuma, kus see saavutab toatemperatuuri ning seejärel liigub läbi termostaadi, kus lisatakse või eemaldatakse õhuniiskus vastavalt vajadusele.

Õhu  $\text{H}_2\text{O}$  ja  $\text{CO}_2$  kontsentratsioonide mõõtmiseks on süsteemis infrapuna-gaasianalüsaator (Li-7000, Li-Cor, Nebraska, USA), mis saadab andmed arvutisse, kus programm arvutab vastavalt mõõtmistulemustele (õhutemperatuur, õhuvoolu kiirus, lehepindala,  $\text{H}_2\text{O}$  ja  $\text{CO}_2$  kontsentratsioonid) kambris oleva taime transpiratsiooni ja fotosünteesi kiirused, kasutades sissetuleva ja väljamineva õhu erinevust (Kollist jt, 2007).

### 2.2.3 Katsete ülesehitus

Enne katse algust seadsin aparatuuri mõõtevalmis järgmistel tingimustel: suhteline õhuniiskus 60-70%; taimele langev PPFD 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; temperatuur 24°C. CO<sub>2</sub> kontsentratsioon oli vastavalt välisõhule ~420 ppm. Taimed stabiliseerusid neis tingimustes 1-1,5 tundi ning seejärel pritsisin ABA lahusega või muutsin CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni.

ABA katsetes avasin mõõtekambri mõneks sekundiks ja pritsisin iga taime 4-5 pihustusega kohe peale tema mõõtetsükli lõppemist. Peale pritsimist sulgesin mõõtekambri ja mõõtmine jätkus veel *c.a* tund aega. ABA lahused antud töös valmistasin 5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  ja 50  $\mu\text{M}$  kontsentratsioonidega destilleeritud vees, mis sisaldasid lisaks ABA-le vastavalt veel 0,05%/0,25%/0,5% etanooli ja 0,012% Silwet L-77 detergenti. Odrasortidel jäid ABA katsete kordused vahemikku 4-8, maisisortidel ja osjadel vahemikku 5-6. Kontrollkatse teostas kahe odrasordiga (Barke ja Golden Promise; n=3-5; Lisa 3), pritsides neid destilleeritud vees lahustatud 0,05% etanooli ja 0,012% Silwetiga.

Kõrge süsihappegaasi katses osjadega tõstsin pärast stabilisatsiooniperioodi mõõtekambris CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni 60 minutiks 800 ppm peale. Seejärel langetasin CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni taas algväärtuseni ning hoidsin taaskord tund aega.

Katsete lõppedes lõikasin kambris olnud taimematerjali, pildistasin ja mõõtsin ImageJ (NIH, USA) programmiga taime pindala, sest gaasivahetustunnused arvutatakse lehe pinnaühiku kohta. Osjade puhul sain pildistades projektsioonipindala ja korrutasin selle kahega, leides niimoodi kogupindala kuna erinevalt planaarsest taimelehtedest on osjalehtedel neli külge.

#### 2.2.4 Andmeanalüüs

Edasises andmetöötluses kasutasin Excelis (Microsoft, 2017) spetsiaalselt selleks otstarbeks tehtud programmi, mis arvutas transpiratsiooni- ja netofotosünteesi kiirused, kasutades igasse kambrisse siseneva ja sealt väljuva õhu  $H_2O$  ja  $CO_2$  kontsentratsioonide vahet, õhuvoolu kiirust kambrites ning kambris olnud lehestiku täpset pindala. Järgnevalt leidis programm lehe summaarse juhtivuse transpiratsiooni ja õhutemperatuurist lähtudes arvutatud lehetemperatuuri põhjal ning summaarsest juhtivusest omakorda õhulõhede juhtivuse (gs), lahutades piirkihi ja kutikulaarse juhtivuse väärtused.

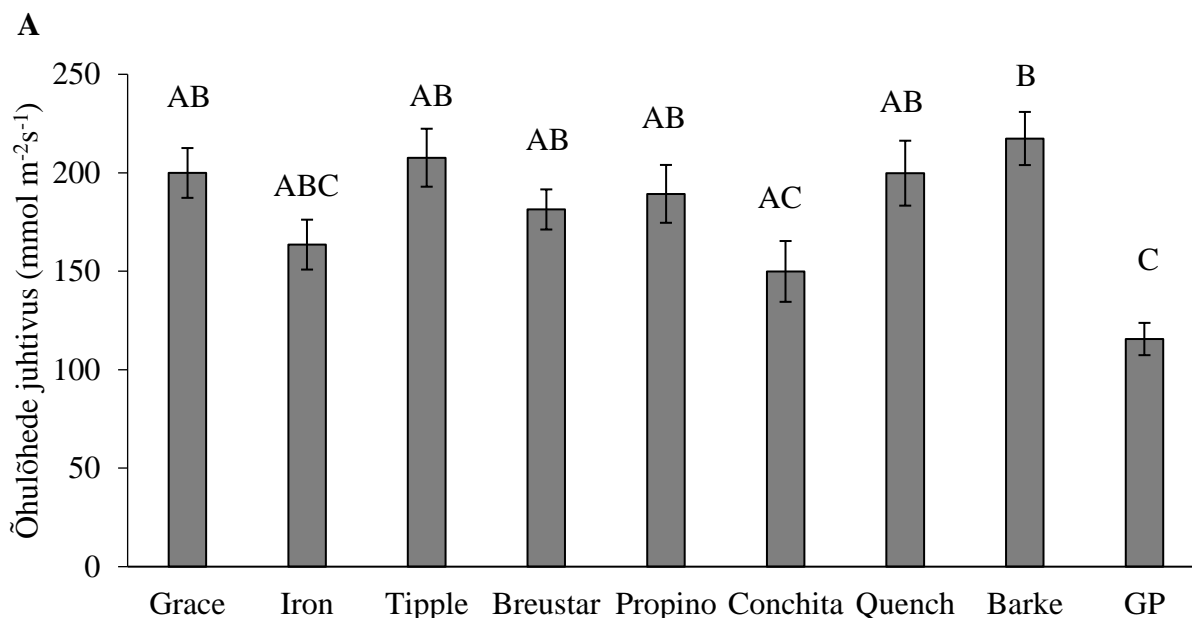
Andmete ühtlustamiseks arvutasin kõikides katsetes libisevad keskmised. Iga esitatud ajapunkt on keskmine kolmest ajapunktist – eelnev, hetkeline ja järgnev – v.a töötuseelne punkt (gs0), mis on kahe punkti keskmine – eelnev ja hetkeline.

Statistilise analüüsi tegin programmiga Statistica (v 7.1, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Sortidevaheliste erinevuste hindamiseks kasutasin ühemõõtmelist ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey HSD testi. Stiimuli mõju hindamiseks gaasivahetustunnustele kasutasin korduvmõõtmistega dispersioonianalüüsi (Repeated Measures ANOVA) ning *post hoc* testina Tukey HSD testi. Lineaarse regressiooni hindamiseks kasutasin GLM (*General Linear Models*) regressioonanalüüsi. R-väärtused kontrollisin ka Excelis üle.

## 2.3 Tulemused

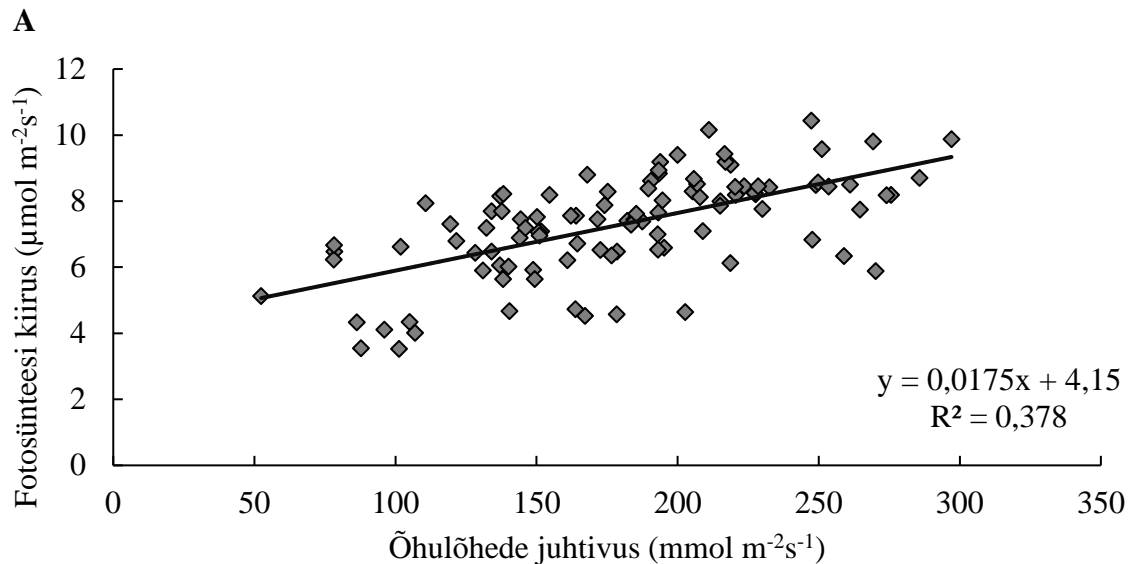
### 2.3.1 Otrade basaalne õhulõhede juhtivus ning ABA-tundlikkus

Uuritud odrasortide basaalne õhulõhede juhtivus (hästikastetud taimede stabiilne õhulõhede juhtivus kontrolltingimustes) varieerus 1,8 korda, kõrgeim keskmine juhtivus ilmnis sordil Barke ja kõige madalam sordil Golden Promise (GP; Joonis 5).



Joonis 5. Odrasortide basaalsed õhulõhede juhtivused (keskmine  $\pm$  standardviga) kontrolltingimustes (suhteline õhuniiskus 65-70%; valgusintensiivsus 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ;  $[\text{CO}_2]$  ~420 ppm). Statistiliselt olulised erinevused sortide vahel on märgitud tähtedega, mis saadi, kasutades ühemõõtmelist ANOVAT ja *post hoc* testina Tukey HSD testi.  $n=8-12$

Kõikide sortide andmeid kokku pannes ilmnis positiivne korrelatsioon õhulõhede juhtivuse ja fotosünteesi kiiruse vahel kontrolltingimustes: mida kõrgem oli õhulõhede juhtivus, seda suurem oli fotosünteesi kiirus ning see korrelatsioon oli statistiliselt oluline ( $p<0,05$ ; Joonis 6).

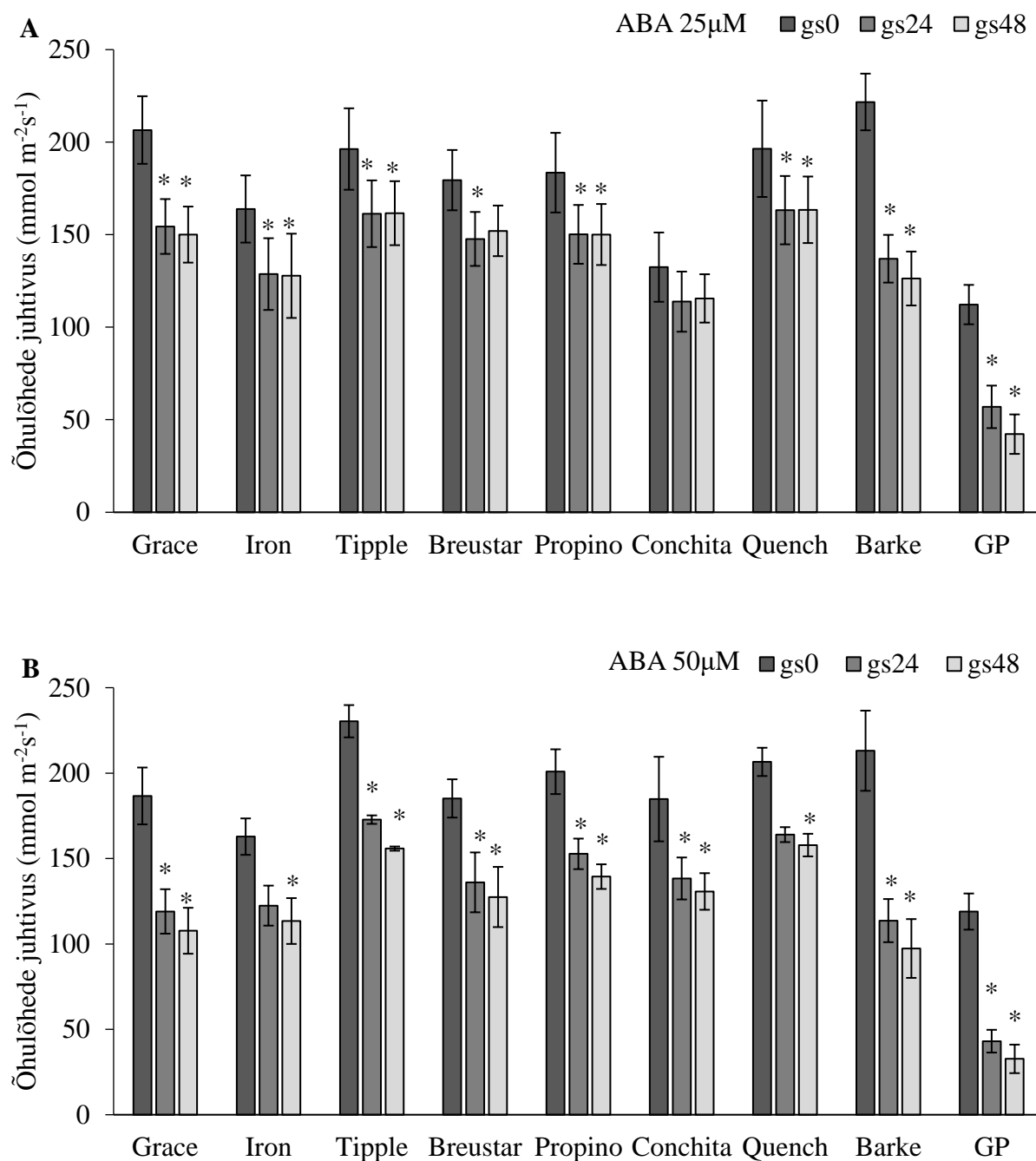


Joonis 6. Otrade õhulõhede juhtivuse ja netofotosünteesi kiiruse omavaheline korrelatsioon. Lineaarne regressioon oli statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ).

Otrade ABA-ga pritsimise esialgsed katsed näitasid, et nende õhulõhede tundlikkus  $5 \mu\text{M}$  ABA kontsentratsiooni suhtes oli oluliselt väiksem kui *A. thaliana*-l (andmed pole näidatud). Järgnevas katsetes kasutasin kõrgemaid ABA kontsentratsioone. Kõikidel otradel õhulõhede juhtivus langes  $25 \mu\text{M}$  ABA lahusega pritsides, kuid Conchital polnud see langus statistiliselt oluline (Joonis 7A). Katse lõpuks, 48 minutit peale pritsimist, oli juhtivus vähenenud olenevalt sordist 15-62% pritsimiseelsega (gs0) võrreldes (Lisa 2A, Lisa 4A). Kõige ABA-tundlikum sort oli Golden Promise, mille juhtivus vähenes katse lõpuks 62%, talle järgnesid Barke (43%) ja Grace (27%).

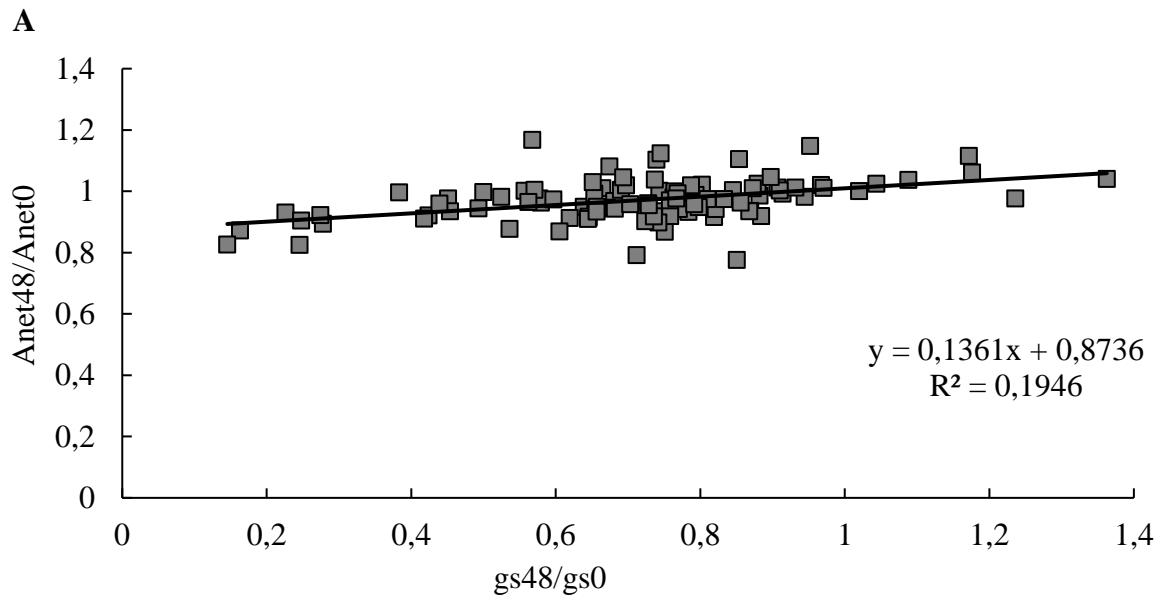
Veel kõrgema ABA kontsentratsiooniga ( $50 \mu\text{M}$ ) pritsides langes juhtivus statistiliselt oluliselt kõigil üheksal sordil (Joonis 7B), katse lõpuks oli juhtivuse vähenemine 24-76% esialgses võrreldes (Lisa 2B, Lisa 4B). Ka selle ABA kontsentratsiooni puhul olid kõige tundlikumad Golden Promise 72%-lise langusega, järgnesid taas Barke (54%) ja Grace (42%) ning kõige tundetum oli Quench (24%). Mõlema ABA kontsentratsiooni puhul oli vastus toimunud juba 24 min peale pritsimist.

Võrreldes omavahel juhtivusi 24 ja 48 minutit peale pritsimist (gs24 ja gs48) selgus, et esimene oli alati suurem, ühe erandiga (Breustar  $25 \mu\text{M}$  ABA). See tähendab, et katse kestel ei ilmnunud märke õhulõhede juhtivuse taastumisest (Joonis 7A/7B).



Joonis 7. Odrasortide juhtivused (keskmine  $\pm$  standardviga) enne (gs 0), 24 minutit (gs24) ja 48 minutit (gs48) pärast ABA lahusega [25  $\mu$ M (**A**) ja 50  $\mu$ M (**B**)] pritsimist. Statistiliselt olulised erinevused antud sordi gs0 väärtusega võrreldes on märgitud tärniga (\*), mis saadi, kasutades korduvmõõtmistega ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey HSD testi. (**A**) n=4-8; (**B**) n=4-5



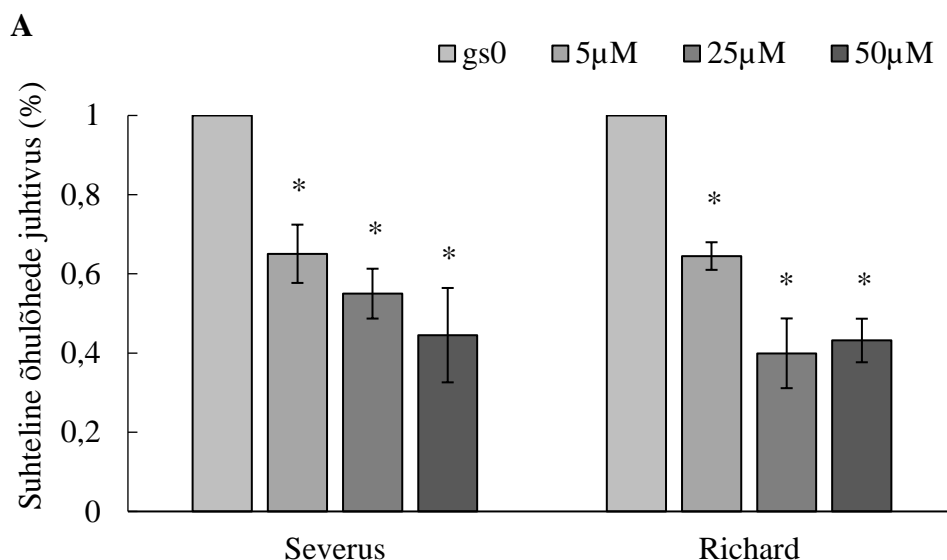


Joonis 8. ABA-ga pritsimise järgse ja pritsimiseelse õhulõhede juhtivuse suhte ( $gs_{48}/gs_0$ ) ja fotosünteesi kiiruse suhte ( $Anet_{48}/Anet_0$ ) omavaheline korrelatsioon otradel. Lineaarne regressioon oli statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ).

Järgnevalt arvutasin, kuidas mõjutas ABA fotosünteesi (48 minutit peale pritsimist) pritsimiseelsete vastavate väärtuste suhtes. Kui õhulõhede juhtivus enamasti langes ABA toimel ( $gs_{48}/gs_0 < 1$ ), siis fotosünteesi puhul oli ABA-toimeline langus märksa väiksem kui õhulõhede juhtivuse langus.  $Anet_{48}/Anet_0$  väärtused varieerusid vahemikus 0,78-1,17, samas kui  $gs_{48}/gs_0$  väärtused varieerusid vahemikus 0,15-1,36 (Joonis 8). Korrelatsioon ABA-toimelise õhulõhede juhtivuse vähenemise ja fotosünteesi vähenemise vahel oli statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ), ehkki korrelatsioonikordaja ei olnud väga kõrge. Seega, juhtivuse langes korrelatsioon fotosünteesiga säilis, kuid õhulõhede ABA-tundlikkus oli oluliselt suurem kui fotosünteesi oma.

### 2.3.2 Maisi õhulõhede ABA-toimeline reaktsioon

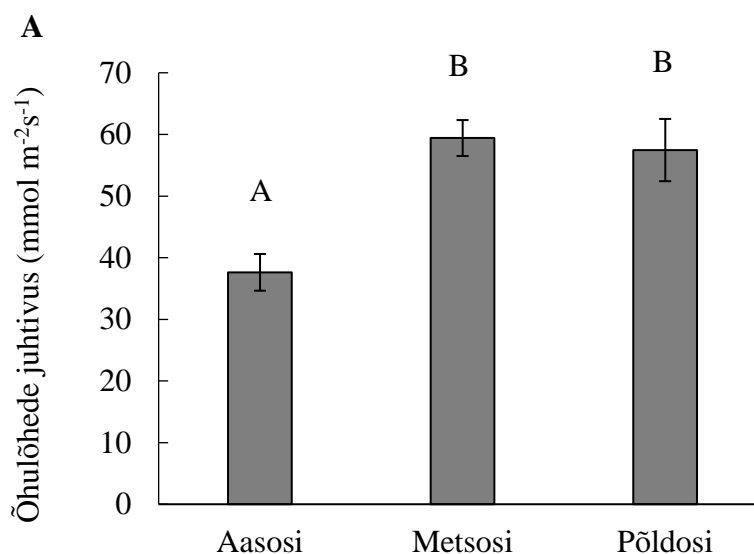
C<sub>4</sub>-taimedele omaselt olid ka siin kasutatud maisisortide õhulõhede juhtivuste basaalsed väärtused väga madalad, ulatudes napilt üle 20 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Mõlemad maisisordid reageerisid kõikidele kasutatud ABA kontsentratsioonidele. Vastusena 5 µM ABA-le langes juhtivus mõlemal sordil 48 minuti jooksul samaväärselt – 35%. 25 µM ABA toimetel oli juhtivuse langus suurem, ulatudes Richardil 61%-ni. 50 µM ABA kontsentratsioonil oli mõju mõlema sordi juhtivusele 55-57% langust esialgse juhtivusega võrreldes (Joonis 9).



Joonis 9. Maisi õhulõhede suhtelised juhtivused koos standardveaga 48 minutit peale erinevate (5 µM, 25 µM ja 50 µM) ABA kontsentratsioonidega töötlemist esialgse juhtivuse (gs0) suhtes. Statistiliselt olulised erinevused sordi gs0 väärtusega võrreldes on tähistatud tärniga (\*), mis saadi, kasutades korduvmõõtmistega ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey HSD testi. n=5-6

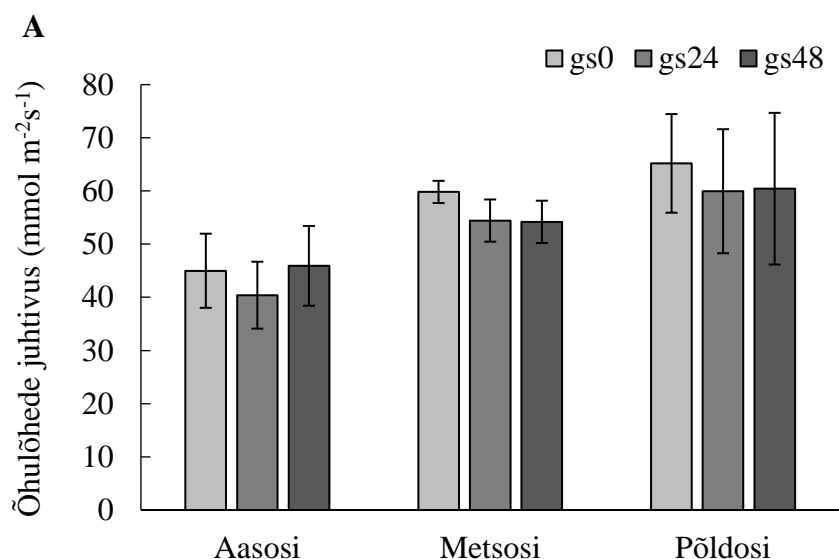
### 2.3.3 Gaasivahetuskatsed kolme osja liigiga

Osjade basaalne õhulõhede juhtivus oli madalam võrreldes otradega, kuid kõrgem kui maisil (Joonis 10).



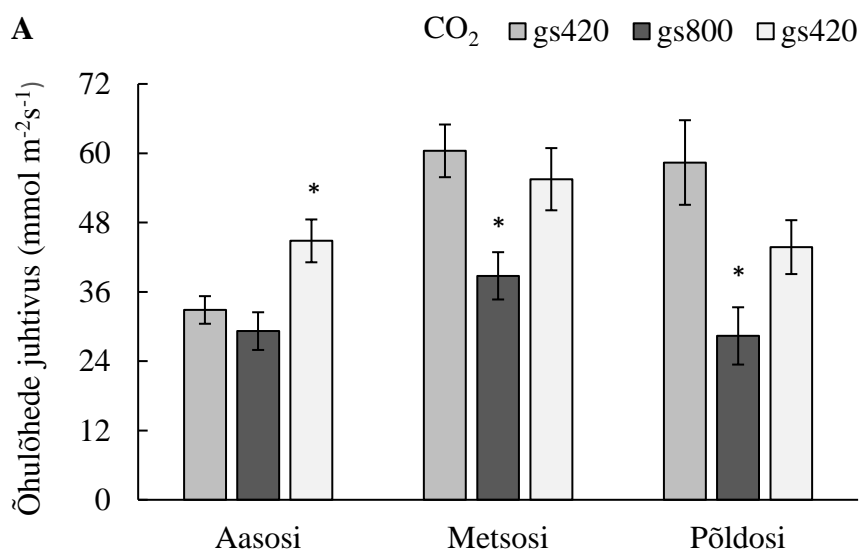
Joonis 10. Osjade basaalsed õhulõhede juhtivused (keskmine  $\pm$  standardviga) normaaltingimustel. Statistiliselt olulised erinevused liikide vahel on märgitud tähtedega, mis saadi, kasutades ühemõõtmelist ANOVA't ning *post hoc* testina Tukey HSD testi.  $n=18-20$

Osjade ABA-ga pritsimisel alustasin katseid madalamate ABA kontsentratsioonidega (5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ), mis mingit mõju juhtivusele ei avaldanud (andmeid pole esitatud). Seetõttu tegin lõpliku katseseeria 50  $\mu\text{M}$  ABA kontsentratsiooniga. Tulemusena võib öelda, et katses olnud osjad olid ABA suhtes tundetud, ka 50  $\mu\text{M}$  ABA kontsentratsiooniga pritsides ei langenud juhtivus statistiliselt oluliselt (Joonis 11).



Joonis 11. Osjade õhulõhede juhtivused (keskmine  $\pm$  standardviga) enne, 24 ja 48 minutit peale 50  $\mu$ M ABA lahusega pritsimist. Statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud (korduvmõõtmistega ANOVA).  $n=5-6$

Osjadega tegin lisaks ABA-ga pritsimisele ka õhu [ $\text{CO}_2$ ] muutmise katse, et uurida, kas nende evolutsiooniliselt vanade taimede õhulõhed reageerivad mõne teise abiootilise faktori toimel.  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooni tõustes langes õhulõhede juhtivus statistiliselt oluliselt metsosjadel ning põldosjadel, kuid mitte aasosjadel. Normaalse  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooni taastudes tõusis õhulõhede juhtivus kõigil kolmel liigil (Joonis 12).



Joonis 12. Osjade õhulõhede juhtivused katse alguses tavapärase  $\text{CO}_2$  juures (gs420), 48 minutit peale õhu  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooni tõstmist 800 ppm-ni (gs800) ja 48 minutit peale normaalse  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooni taastamist (gs420). Statistiliselt olulised erinevused juhtivuste vahel võrreldes esialgse gs420-ga sama liigi sees on tähistatud tärniga (\*), mis saadi, kasutades korduvmõõtmistega ANOVA-t ja post hoc testina Tukey HSD testi.  $n=8$

## 2.4 Arutelu

### 2.4.1 Otrade varieeruv ABA-tundlikkus

Töös kasutatud abstsiihappe kontsentratsioonid varieerusid 10x (5-50  $\mu\text{M}$ ). Esialgsetes katsetes 5  $\mu\text{M}$  lahusega pritsides, kui polnud veel kaasatud sorte Barke ja Golden Promise, otrade õhulõhede olulist sulgumist ei tuvastatud (andmed pole näidatud). Õhulõhede sulgumiseks 50% ulatuses metsiktüüpi *A. thaliana* piisab juba 5  $\mu\text{M}$  lahusest (Merilo *et al.*, 2015; Hõrak *et al.*, 2017; Jalakas *et al.*, 2018). Samuti, sarnast metoodikat kasutades põhjustab 10  $\mu\text{M}$  ABA nisul keskmiselt 30%-lise juhtivuse languse (Meigas, bakalaureusetöö, 2017). Seega viitasid esialgsed katsed, et oder on teiste taimedega võrreldes suhteliselt ABA-tundetum ning motiveerisid tegema katseseeria kõrgemate ABA kontsentratsioonidega. Selgus, et otrade õhulõhede ABA-tundlikkus on väga varieeruv, 25  $\mu\text{M}$  ABA toimeel langes juhtivus 15-62% pritsimiseellega võrreldes, 50  $\mu\text{M}$  ABA toimeel aga 24-76%. Lisaks selgus, et hiljem katsesse võetud sordid Barke ja Golden Promise olid ABA-tundlikumad kui esialgse katse seitse sorti. Leidis kinnitust ka klassikaline õhulõhede juhtivuse ja netofotosünteesi kiiruse korrelatsioon, nii enne kui peale ABA-töötlust (Bunce, 2000).

Otra peetakse *Triticeae* liikidest põuale üheks kõige vastupidavamaks (López-Castañeda ja Richards, 1994a). Taimesisene ABA kontsentratsiooni tõus on oluline osa põuavastusest, vähendades muude stressireaktsioonide hulgas ka õhulõhede avatust (Ma *et al.*, 2018). Selles kontekstis on iseäranis huvitav, et enamikule minu töös uuritud odrasortide õhulõhede juhtivustele avaldas kõrgeim kasutatud ABA kontsentratsioon (50  $\mu\text{M}$ ) suhteliselt väikest mõju, erandiks siin olid Barke ja Golden Promise. Odra suuremat põuataluvust on seostatud tema kiire lehekasvu ja ulatusliku juurestikuga (López-Castañeda ja Richards, 1994a; López-Castañeda ja Richards, 1994b). Metsikutel odraliinidel on põuas kasvanud taimede lehesisese ABA kontsentratsiooni mõõtmisega näidatud, et põuda talumatel liinidel on ABA tase kõrgem kui põuatundlikel (s.h ka ühel kultiveeritaval odrasordil; Zhang *et al.*, 2015). Lehesisese ABA kontsentratsiooni mõõtmine normaaltingimustes ja pärast ABA-ga pritsimist siin uuritud sortide võrdluses aitaks ilmselt selgitada suurt varieeruvust õhulõhede ABA-tundlikkuses. Molekulaartaseme uuringud on näidanud, et ABA signalisatsioon osaleb odra stressitaluvuse tagamisel (Gürel *et al.*, 2016). Seega peaks odrad olema üldiselt ABA-tundlikud.

Schäfer *et al.* (2018) on näidanud, et odra ulatuslikumaks õhulõhede sulgumiseks ABA-toimeel on vaja nitraadi ( $\text{NO}_3^-$ ) olemasolu transpiratsioonivoos (13% sulgumine nitraadita; 40% sulgumine nitraadiga). Selle põhjuseks on mutatsioonid odra SLAC1 (HvSLAC1) anioonkanali transmembraanses domäänis TMD3, mis teevad kanali tundlikuks nitraadi suhtes (Schäfer *et al.*, 2018). Schäfer *et al.* (2018) katsetes kasutatud odrasort oli ka minu töös

esindatud Barke, seega on nende tulemused mõnevõrra vastuolus minu omadega: minu katsetes oli Barke üks ABA-tundlikemaist sortidest (Joonis 7A, 7B) ja reageeris isegi 5  $\mu\text{M}$  lahusele (30%-line õhulõhede sulgumine; andmeid pole esitatud). Erinevused võisid tuleneda teistsugusest meetodikast: mina pritsisin ABA lahust taime küljes olevate lehtede pinnale, aga nemad lisasid ABA/ABA+NO<sup>-3</sup> lõigatud võrsetele, mida hoiti katseklaasis. Otrade ksüleemivedelik sisaldab normaalingimustel erinevaid ioone, sealhulgas ka nitraati (Mulholland *et al.*, 1999), mis võib seletada minu poolt leitud tugevat ABA reaktsiooni Barkel; lehtedes sisaldus piisavalt nitraati SLAC1 funktsiooni tagamiseks. Selle kinnitamiseks võiks teha seeria katseid, kasvatades otrasid erinevatel lämmastikväetistel (nitraat, ammoniaak) ja vaadata, kas nitraati sisaldaval substraadil otrade õhulõhede reaktsioonid ABA lahusega pritsimisel suurenevad.

Odra SLAC1 anioonkanali nitraaditundlikkus pole siiski piisav, põhjendamaks minu töös olnud odrasortide ABA-tundlikkuse suurt varieeruvust. See eeldaks, et eri odrasortide SLAC1 kanali nitraaditundlikkus on erinev ja põhjustas sorditi erineva ulatusega õhulõhede ABA-vastuse sõltuvalt nitraadisisaldusest sulgrakkudes. Borel *et al.*, (1997) veestressi katsetes, uurides muuhulgas seoseid õhulõhede juhtivuse ning ksüleemi ABA-sisalduse vahel erinevatel põuatundlikel ja -tolerantsetel odrasortidel, leiti samuti varieeruvus õhulõhede tundlikkuses ABA suhtes. Suurem ABA-tundlikkus ei korreleerunud siiski põuataluvusega, vaid hoopis hilisema õitsemisajaga (Borel *et al.*, 1997). Seega võivad erinevused odrasortide õhulõhede ABA-tundlikkuses olla tingitud ka erinevustest nende fenoloogias.

Sekveneerides genoome metsikutel otradel, kes olid kohastunud kasvama erineva veerežiimiga tingimustes, leiti põuatolerantsetel genotüüpidel esiteks madalam juhtivus ning teiseks selektiivne surve paljudele genoomiregioonidele, s.h ABA-signaaliraja komponente sisaldavatele aladele (PYL2, SLAC1, SLAH1, SLAH2, PP2C-d). Lisaks tuvastati nende liinide vahel mitmeid tõenäolisi PP2C-fosfataaside analooge (Wang *et al.*, 2018). Odrasortide vahel on näidatud erinevusi ka soolastressi (kutsutakse esile põuaga sarnast füsioloogilist vastust) poolt indutseeritud ABA signaaliraja komponentide (PP2C, PYR1, PYR2 ja SnRK2) geeniekspressioonis (Kamboj *et al.*, 2014). Minu töös leitud suurt sortidevahelist varieeruvust ABA-tundlikkuses võivad seega seletada nii variatsioonid nende ABA signaaliraja komponentide DNA-järjestustes, mis võivad muuta ABA signalisatsiooni rohkem või vähem tundlikuks ABA suhtes, kui ka erinevused nende geenide ekspressioonitasemetes.

Odrasort Golden Promise (GP) oli minu katsetes unikaalne võrreldes teiste uuritud sortidega, omades kõige madalamat basaalselt õhulõhede juhtivust ning ühtlasi ka kõige tugevamat õhulõhede sulgumise reaktsiooni. GP introdutseeriti 1965. aastal, tegemist on gamma-kiirgust

kasutades saadud liiniga (Holmes, 2018). Ta kogus kiirelt populaarsust põllumeeste hulgas tänu oma varasemale õitsemisele, lühikesele kasvule ja paranenud vastupidavusele vee- ja soolastressi suhtes (Forster, 2001). Geenianalüüsid tuvastasid, et selle põhjuseks on *loss-of-function* mutatsioon kõrrepikkust ja terasuurst reguleerivas HvDEP1 geenis (Wendt *et al.*, 2016). GP parem saagikus stressitingimustes teiste tolleaegsete sortide kõrval tulenes eelkõige tema varasemast valmimisest, kuid soodsamatel kasvuaastatel võis tema saagikus alla jääda teistele sortidele (Wendt *et al.*, 2016; Holmes, 2018). ABA kontsentratsioon GP lehtedes 16 liini võrdluses oli viiendal kohal ja oma vanemliinist kõrgem nii kontrolltingimustes kui ka soolastressis (Kamboj *et al.*, 2014). Võrreldes Golden Promise ühe Iraagist pärit põuatolerantse odrasordiga leiti, et normaaltingimustel GP kaotab poole rohkem vett, aga põuastressis õhulõhede juhtivused liinide vahel ei erine (Wendelboe-Nelson ja Morris, 2012).

Kõike eelnevat kokku võttes, võivad seega uuritud otrade õhulõhede juhtivuse ja ABA-regulatsiooni erinevused tuleneda erinevustest lehesiseses ABA kontsentratsioonis, fenoloogias, ABA-signaaliraja komponentide geenijärjestustes ja ka nende ekspressioonitasemetes. Otsesid järeldusi põuataluvuse kohta põllul minu poolt uuritud sortide võrdluses teha ei saa, kuna pole võrdlevaid andmeid saagikuse osas normaal- ja stressitingimustes. ABA-reaktsioonide põhjal võib siiski oletada, et töös kasutatud sortidest võivad olla kõige parema põuataluvusega Golden Promise, talle järgneda Barke ja Grace (Joonis 7A, 7B; Lisa 2A, 2B).

#### **2.4.2 Maisi õhulõhede ABA tundlikkus**

Bakalaureusetöö katsetes maisiga (sort Vivacity) õhulõhed ei sulgunud 10  $\mu\text{M}$  ABA toimel (Meigas, 2017). Sellest tulenevalt valisin magistritöösse teised maisisordid ja kasutasin ka kõrgemaid ABA kontsentratsioone (kuni 50  $\mu\text{M}$ ). Selgus, et mõlemal sordil langesid juhtivused umbes 35% esialgse juhtivuse suhtes juba 5  $\mu\text{M}$  ABA toimel. ABA kontsentratsiooni tõustes suurenes ka juhtivuse languse määr. Seega võib nende tulemuste põhjal esiteks järeldada, et sortidevaheliselt ABA tundlikkus varieerub. Maisi ABA signaalirada on leitud olevat üldjoontes sarnane *A. thaliana* omaga, koosnedes samuti PYR/PYL retseptoritest, PP2C-fosfataasidest ja SnRK-kinaasidest (ZmOST1; Xiang *et al.*, 2017). Maisi PP2C fosfataaside puhul on leitud suur looduslik varieeruvus ning identifitseeritud eri allelele, millega kaasnevad ka erinevused stressitaluvuses (He *et al.*, 2019). Seega on sortidevahelised geneetilised erinevused ABA-tundlikkuses täiesti võimalikud ning võimalik on selle geneetilise erinevuse kasutamine sordiaretuses näiteks põuatolerantsuse tõstmiseks.

Bakalaureusetöös alustatud diskussioon, et maisi lehesisene ABA kontsentratsioon võib olla kõrgem teiste liikidega võrreldes ning maisi õhulõhed võivad seetõttu vajada sulgumise algatamiseks kõrgemaid ABA kontsentratsioone (Kriedemann *et al.*, 1972; Larqué-Saavedra ja Wain, 1976; Meigas, 2017) leidis osaliselt kinnitust: mida kõrgemat ABA kontsentratsiooni pritsimiseks kasutasin, seda ulatuslikumalt õhulõhed sulgusid.

Bakalaureuse- ja magistritöö katsetes maisiga ilmnas kolmekordne erinevus sortide basaalses õhulõhede juhtivuses, mis võib olla tingitud nii geneetilistest erinevustest kui keskkonnast. Nimelt oli bakalaureusetöö gaasivahetuskatsetes PPFD 500  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , ent magistritöös mõnevõrra madalam, 300 PPFD  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . See umbes 1,7 kordne erinevus valgusintensiivsuses ei ole siiski ilmselt piisav seletamaks juhtivuste erinevusi, eriti arvestades, et maisi õhulõhede juhtivuse ja valgusintensiivsuse vahel ei leitud väga tugevat korrelatsiooni – pigem oli juhtivus seotud lehesisese  $[\text{CO}_2]$ -ga (Raschke *et al.*, 1978). Lisaks erinevustele katseaegses valgusintensiivsuses erinesid vähesel määral ka kasvutingimused bakalaureuse- ja magistritöö maisitaimede kasvatamisel: kui eelnevalt kasvasin maisi sarnaselt siin töös otradele ja osjadele Percivali kasvukambris samadel sihtmärkväärtustel (vt. peatükk 2.2.1), siis seekord kasvasin maisi kasvutoas konstantsel temperatuuril 23°C-24°C ja 10-20% madalama õhuniiskusega. Kontrollkatsetes Percivali kambris kasvanud samade maisisortidega ei esinenud erinevusi basaalses juhtivuses ja õhulõhede reaktsioonis ABA-le (5-50  $\mu\text{M}$ ) võrreldes kasvutoas sirgunud maisidega (andmed pole esitatud).

Kokkuvõtteks võib öelda, et katses olnud maisisortide õhulõhede juhtivused reageerisid ABA-le statistiliselt olulise sulgumisega kontsentratsioonist sõltuvalt: mida kõrgem ABA kontsentratsioon, seda suurem sulgumine. Õhulõhede ABA-toimelise sulgumise tendents oli olemas ka bakalaureusetöös, ehkki statistiliselt oli see mitteoluline (Meigas, 2017). Kas katsetes leitud erinevused maisisortide basaalses õhulõhede juhtivuses ja ABA-tundlikkuses on seletatavad geneetiliste või keskkonnafaktoritega, vajab edasist uurimist.

#### **2.4.3 Osjade basaalne juhtivus ning õhulõhede puuduv ABA vastus**

Minu töös ilmnas, et osjade basaalne juhtivus varieerus vahemikus 37-60  $\text{mmol m}^{-1}\text{s}^{-2}$ , need väärtused on üldiselt madalamad võrreldes otrade juhtivustega (Joonis 5 ja Joonis 10) ning ka Taimesignaalide uurimisrühma põhilise uurimisobjekti *A. thaliana* omaga (Merilo *et al.*, 2014; Hõrak *et al.*, 2017; Merilo *et al.*, 2018). Teiste evolutsiooniliselt vanade taimede, sõnajalgade, juhtivus varieerus samas gaasivahetussüsteemis vahemikus 30...50  $\text{mmol m}^{-1}\text{s}^{-2}$  (Hõrak *et al.*, 2017), olles seega võrreldav osjade omaga. Kirjandusest leiab andmeid osjade gaasivahetusest napilt. Põldosja (*E. arvense*) õhulõhede juhtivus võrreldava valgusintensiivsuse juures jäi vahemikku 15-20  $\text{mmol m}^{-1}\text{s}^{-2}$  kasvutingimustes, mis



mõnevõrra erinesid minu töö omadest (valgusrežiim 16h/8h, temperatuurid vastavalt 20°C/15°C; 190  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PPFD; Andersson ja Lundegårdh, 1999). Lõuna-Aafrika hiidosjadel (*E. giganteum*) leiti, et osjatüvede keskmised juhtivused olid keskpäeval (PPFD ulatub kuni 1700  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -ni) umbes 60  $\text{mmol m}^{-1}\text{s}^{-2}$  ning langesid öhtul (PPFD umbes 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 30  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  peale (Husby *et al.*, 2014). Lihtsad veekao katsed on näidanud, et veekogude läheduses kasvav konnaosi (*E. fluviatile*) kaotab enam kui poole rohkem vett võrreldes põldosjaga (Dodd, 1919). Seega minu töös saadud andmed kinnitavad varasemalt leitud, et osjadel ongi loomupärastelt madal õhulõhede juhtivus.

Katses olnud kolmest osjast kõige madalam õhulõhede basaaluhtivus mõõdeti aasosjal (*E. pratense*), mis võib viidata tema kohastumusele kuivema kasvukeskkonnaga võrreldes mets- ja põldosjaga (Staniforth, 2013). Samas tuleb tunnistada, et uuritud osjade kasvualad tihtipeale kattuvad ning CO<sub>2</sub>-katses jõudis aasosjade õhulõhede juhtivus tavapärase [CO<sub>2</sub>] taastamisel kõrge kontsentratsiooni järgselt mets- ja põldosjadega võrreldavale tasemele (Joonis 12). Seetõttu suuri järeldusi kasvukeskkonna niiskusréžiimi ja laboris mõõdetud õhulõhede juhtivuste seosest teha ei saa.

Hetkel on käimas debatt aktiivse, ABA-st sõltuva õhulõhede regulatsiooni evolutsioonilise päritolu ja vanuse üle. Brodribb ja McAdam (2011) näitasid katsetega mitmete sõnajala ning koldtaimede liikide peal, et nende iidsete soontaimede õhulõhede regulatsioon ei ole ABA-st sõltuv, vaid toimub passiivselt koos üldise turgori vähenemisega. Hõrak *et al.* (2017) tegid gaasivahetuskatsetega kindlaks, et mõned sõnajalaliigid on võimelised reageerima ABA-le (10  $\mu\text{M}$ ) ning võime reageerida sõltub kasvutingimustest. Siiski oli sõnajalgade ABA-toimeline juhtivuse langus palju väiksem ning nende reaktsioonikiirus aeglasem kui kontrollina kasutatud *A. thaliana*-l.

Sõnajalgtaimede genoomis on tuvastatud ABA signaaliraja komponente ning epidermiseribadega tehtud katsetes on sõnajalgadel näidatud märkimisväärset õhupilu vähenemist vastusena 50  $\mu\text{M}$  ABA lisamisel (Cai *et al.*, 2017), mis omakorda kinnitab ABA toimet sulgrakkudele. Minu töös tehtud gaasivahetuskatsed osjadega näitasid, et nende õhulõhed pole ABA-tundlikud. Praegu pole veel andmeid osjade genoomijärjestustest ning sellest, kas seal leidub ABA signaaliraja komponentide analooge. Samuti on raske öelda, kui palju ABA pritsimisel üldse sulgrakkudesse pääseb, arvestades, et osjade sulgrakud peituvad kaasrakkude all (Dayanandan ja Kaufman, 1973). Kuna osjade puhul ei ilmnenu ka suhteliselt kõrgete ABA kontsentratsioonide puhul mitte mingit mõju õhulõhede juhtivusele, võib kokkuvõtteks siiski öelda, et antud osjaliikidel õhulõhede ABA-toimelist regulatsiooni ei tuvastatud.

Võime avada õhulõhesid madala CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni toimetel paistab olevat enam levinud, kui võime sulgeda õhulõhesid [CO<sub>2</sub>] tõustes (Brodribb *et al.*, 2009; Brodribb ja McAdam, 2013). Sarnaselt ABA-st sõltuvale õhulõhede sulgumisele evolutsiooniliselt vanadel taimedel on ka nende CO<sub>2</sub> toimelise sulgumise puhul vastukäivaid andmeid. Mitmetes katsetes on siiski näidatud õhulõhede sulgumist sõnajalgtaimedel CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni tõustes ja see sõltub mõningal määral ka kasvutingimustest (Franks ja Britton-Harper, 2016; Hõrak *et al.*, 2017). Brodribb ja McAdam, (2013) diskuteerisid, et õhulõhede avanemist madalas [CO<sub>2</sub>]-s koordineerib fotosünteesist sõltuv signaalsatsioon, mis oli olemas juba esimestes soontaimedes, kuid kõrges [CO<sub>2</sub>]-s õhulõhede sulgumine on evolutsiooniliselt noorem, katteseemnetaimedele omane adaptatsioon. Minu magistritöö katsed, nagu ka Hõrak *et al.* (2017), Franks ja Britton-Harper (2016) ja Ruszala *et al.* (2011) tulemused näitavad, et kõrge CO<sub>2</sub>-toimeline õhulõhede sulgumine oli olemas juba ürgsetes soontaimedes. Huvitav on muidugi asjaolu, et kõrge [CO<sub>2</sub>] katsetes olid aasosjad unikaalsed oma õhulõhede reaktsiooni osas: [CO<sub>2</sub>] tõustes juhtivus neil ei langenud, kuid tavapärase [CO<sub>2</sub>] taastades juhtivus neil tõusis kõrgemale kui algne juhtivus, kinnitades kaudselt Brodribb ja McAdam (2013) mõttekäiku, et õhulõhede avanemine [CO<sub>2</sub>] langedes on taimeriigis universaalsem.

Minu töö CO<sub>2</sub> katsed demonstreerivad, et osjade õhulõhed on võimelised vaatamata kaasrakkude räniühendite ladestumisest tingitud jäikusele oma õhulõhede avatust reguleerima – see tulemus erineb varasematest arvamustest (Dayanandan ja Kaufman, 1973; Cullen ja Rudall, 2016). Säilib loomulikult võimalus, et katsetes kasutatud osjavõrsed polnud veel piisavalt vanad õhulõhede jäigastumiseks ning et vanusega oleks õhulõhede regulatsioon järkjärgult kadunud. Kokkuvõtteks saab öelda, et CO<sub>2</sub>-toimeline regulatsioon on osjadel olemas, kuid ABA-toimelist regulatsiooni ma ei tuvastanud.

#### 2.4.4 Üldised järeldused

Kõigi üheksa odrasordi õhulõhed sulgusid statistiliselt oluliselt kõrgeima kasutatud ABA kontsentratsiooni (50  $\mu\text{M}$ ) mõjul, sulgumine 25  $\mu\text{M}$  ABA kontsentratsiooni toimet polnud ühe sordi puhul statistiliselt oluline. Katsealuste otrade õhulõhede juhtivus normaalingimustel erines sorditi ning ka ABA-toimelise õhulõhede sulgumise ulatus varieerus suurel määral, viidates sortidevahelistele erinevustele õhulõhede regulatsioonis. Mil määral seostuvad basaalsed õhulõhede juhtivused ja ABA-tundlikkus põuataluvusega, selleks oleks vaja lisakatseid põuastressi, lehe-sisese ABA kontsentratsiooni mõõtmiste ja terasaagi määramisega põllul.

Erinevalt bakalaureusetöös kasutatud maisisordile reageerisid magistritöö maisisortide õhulõhed ABA-le. Mida kõrgem oli kontsentratsioon, seda ulatuslikum õhulõhede sulgumine. Maisi õhulõhede basaalsed juhtivused olid  $C_4$ -taimedele omaselt väga madalad. Selgitamaks, kas maisil on sortidevaheliselt erinevusi ABA-tundlikkuses või olid erinevused bakalaureuse- ja magistritöö õhulõhede vastuses tingitud kasvu- ja katsetingimustest, tuleks katseid korrata, kaasates veel teisi maisisorte. Samuti tasub mõõta järgnevates katsetes ka lehesiseseid ABA-kontsentratsioone.

Osjadel ilmnesevad madalad õhulõhede juhtivused, mis olid töös uuritud maisi omadest siiski kõrgemad. Osjade õhulõhede ABA ei mõjunud, mis kinnitab osaliselt varasemaid andmeid evolutsiooniliselt vanade liikide aktiivse, ABA-st sõltuva õhulõhede regulatsiooni puudumisest.  $\text{CO}_2$ -toimeline õhulõhede regulatsioon on osjadel olemas, kuid liigiti esines erinevusi kõrge  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooni mõjust nende õhulõhede.

## KOKKUVÕTE

Teraviljad on kriitilise tähtsusega kogu maailma rahvastiku toitmisel. Paraku on teraviljade õhulõhede regulatsioon võrreldes mudeltaimedega (*A. thaliana*) oluliselt vähem uuritud, ehkki läbi õhulõhede toimub nii veekadu kui fotosünteesiks vajaliku CO<sub>2</sub> omastamine. Samuti on lünklikud meie teadmised taimede õhulõhede regulatsiooni väljakujunemisest evolutsiooni käigus. Antud töös uuriti ja võrreldi gaasivahetuskatsetega: 1) üheksa odra- ja kahe maisisordi õhulõhede reaktsioone abstsiihappele (ABA); 2) evolutsiooniliselt vanade taimede, osjade, õhulõhede reaktsioone ABA-le ja kõrgele CO<sub>2</sub>-kontsentratsioonile. Katsed teostati termostateeritud 4-kambrilise läbivoolu põhimõttel töötava gaasivahetussüsteemiga, mis on spetsiaalselt mõeldud mõõtmaks teisi taimi peale *A. thaliana*.

Üheksa odrasordi vahel leiti suur varieeruvus nii õhulõhede basaalses juhtivuses kui ka ABA-st tingitud õhulõhede sulgumises. Odraandmestik kinnitas ka olulist positiivset korrelatsiooni õhulõhede juhtivuse ja netofotosünteesi kiiruse vahel. Diskussioonis arutlen, mis võiks suuri erinevusi otrade õhulõhede ABA-tundlikkuses põhjustada ning kuidas see võiks mõjutada nende sortide põuataluvust.

Maisisortidel leiti väga madalad basaalsed õhulõhede juhtivuse väärtused, mis on kooskõlas maisi C<sub>4</sub>-fotosünteesi iseärasustega. Maisi õhulõhed reageerisid kõigile katsetes kasutatud ABA kontsentratsioonidele ning õhulõhede sulgumine oli seda ulatuslikum, mida kõrgem ABA kontsentratsioon.

Osjade õhulõhede juhtivus oli madalam kui otradel ning ABA-le nende õhulõhed ei reageerinud. Genoomsete andmete puudumise tõttu pole hetkel võimalik teha järeldusi ABA signaaliraja komponentide esinemisest osjadel. Vastusena kõrgele CO<sub>2</sub> kontsentratsioonile sulgusid õhulõhed mets- ja põldosjadel, kuid mitte aasosjadel. Taastades [CO<sub>2</sub>] normaalväärtuse avanesid õhulõhed kõigil kolmel liigil. Selle põhjal võib öelda, et CO<sub>2</sub>-sõltuv õhulõhede regulatsioon on osjadel, elavateks fossiilideks kutsutavatel liikidel, olemas.

Odra- ja maisisortidega tehtud katsetes leitud tulemused võivad kaudselt aidata selgitada põuatolerantsust tagavaid faktoreid ning läbi selle panustada ka uute põllukultuuride aretusse. Magistritöös üleskerkinud küsimustele aitaks edaspidi vastata molekulaarbioloogiliste uurimismeetodite rakendamine. Õhulõhede aktiivse ABA-toimelise regulatsiooni puudumist osjadel võiks kinnitada genoomiuuringud, mis selgitavad ABA signaaliraja komponentide esinemist või puudumist osjades.

## Resümee

### ABA-mediated stomatal regulation in cereals and horsetails

Egon Meigas

#### Summary

All land plant leaves have tiny pores called stomata through which they take up CO<sub>2</sub> from the atmosphere and transpire water. Plants can actively regulate their stomatal apertures to optimise gas exchange in changing environmental conditions. Thus, stomatal regulation is associated with plant drought tolerance and crop yields. Even though cereals are essential for feeding the global human population, their stomatal regulation is much less studied compared to model plants such as *Arabidopsis thaliana*. Furthermore the evolutionary origin of active stomatal regulation is unclear.

In this study gas exchange traits and stomatal responses to abscisic acid (ABA; an important plant stress hormone and regulator of stomatal aperture) of nine spring barley cultivars and two maize cultivars were studied, as well as stomatal ABA and CO<sub>2</sub> responsiveness of three horsetail species (*Equisetum*; a group of ancient land plants). Gas exchange experiments were conducted with a custom-made thermostated flow-through gas exchange device designed to measure non-model plants.

Studied barley cultivars showed differences in basal steady-state stomatal conductance and in stomatal sensitivity to ABA. A positive correlation between stomatal conductance and net carbon assimilation rate was detected in barley dataset. Reasons for large differences in stomatal conductance and ABA-sensitivity are discussed, as also how these traits might influence drought tolerance.

Studied maize cultivars showed very low basal steady-state stomatal conductances in accordance with their C<sub>4</sub>-photosynthesis. Stomatal closure of maize plants due to ABA was present and dose-dependent – the higher the ABA concentration used, the stronger the closure.

All three horsetail species exhibited much lower stomatal conductances than barley and stomatal response to ABA was not detected in horsetails. High CO<sub>2</sub> concentration induced stomatal closure in two of the three horsetail species, but when ambient CO<sub>2</sub> levels were restored, even the third species showed stomatal response. Thus CO<sub>2</sub>-dependent stomatal regulation is present in studied horsetails.

Results of barley and maize experiments might serve to unearth factors responsible for drought tolerance and thus contribute to the breeding of new, improved crop varieties. However further research using molecular biology techniques is needed to clarify differences in ABA-sensitivity among genotypes. Horsetail studies showed the presence of active CO<sub>2</sub>-induced stomatal regulation and the lack of ABA-induced regulation, thus extending our knowledge about how active stomatal regulation evolved.

## **TÄNUAVALDUSED**

Kõige enam tänan oma juhendajat Ebe Merilot kannatlikkuse, suurepärase juhendamisoskuse ja nõustamise eest nii kergetel kui rasketel aegadel. Samuti tahan tänada oma suurepärast sõpra ja laborikaaslast Kaspar Koolmeistrit, kelle motiveerivad ja ergutavad sõnad ning meetmed olid kõvasti abiks magistritöö valmimisel. Ei saa loomulikult tänamata jätta ka kursuse kaaslast Helen Parikut ja laborikaaslast Mikk Välbet, Ingmar Tulvat ja Pirko Jalakat kes olid valmis aitama kõiksugude murede puhul ning tegid laboris viibimise aja meeldejäävaks, vaheldusrikkaks ning ääretult positiivseks.

## **VIITED**

- Andersson TN, Lundegårdh B** (1999) Field Horsetail (*Equisetum arvense*): Effects of Potassium under Different Light and Nitrogen Conditions. *Weed Sci* **47**: 47–54
- Aoki S, Toh S, Nakamichi N, Hayashi Y, Wang Y, Suzuki T, Tsuji H, Kinoshita T** (2019) Regulation of stomatal opening and histone modification by photoperiod in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep-UK* **9**: 10054
- Bauer H, Ache P, Lautner S, Fromm J, Hartung W, Al-Rasheid KAS, Sonnewald S, Sonnewald U, Kneitz S, Lachmann N, et al** (2013) The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr Biol* **23**: 53–57
- Bennert W, Lubienski M, Körner S, Steinberg M** (2005) Triploidy in *Equisetum* subgenus *Hippochaete* (*Equisetaceae*, *Pteridophyta*). *Ann Bot* **95**: 807–815
- Borel C, Simonneau T, This D, Tardieu F** (1997) Stomatal Conductance and ABA Concentration in the Xylem Sap of Barley Lines of Contrasting Genetic Origins. *Funct Plant Biol* **24**: 607–615
- Boursiac Y, Lérant S, Corratgé-Faillie C, Gojon A, Krouk G, Lacombe B** (2013) ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci* **18**: 325–333
- Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, Vain P, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, et al** (2011) Brachypodium as a Model for the Grasses: Today and the Future [W]. *Plant Physiol* **157**: 3–13
- Brodrick TJ, McAdam SAM** (2013) Unique Responsiveness of Angiosperm Stomata to Elevated CO<sub>2</sub> Explained by Calcium Signalling. *PLOS ONE* **8**: e82057
- Brodrick TJ, McAdam SAM, Jordan GJ, Feild TS** (2009) Evolution of stomatal responsiveness to CO<sub>2</sub> and optimization of water-use efficiency among land plants. *New Phytol* **183**: 839–847
- Brownlee C** (2018) Stomatal Physiology: Cereal Successes. *Curr Biol* **28**: R551–R553
- Brutnell TP, Wang L, Swartwood K, Goldschmidt A, Jackson D, Zhu X-G, Kellogg E, Eck JV** (2010) *Setaria viridis*: A Model for C<sub>4</sub> Photosynthesis. *Plant Cell* **22**: 2537–2544
- Bunce JA** (2000) Responses of stomatal conductance to light, humidity and temperature in winter wheat and barley grown at three concentrations of carbon dioxide in the field. *Global Change Biol* **6**: 371–382
- Cai S, Chen G, Wang Y, Huang Y, Marchant DB, Wang Y, Yang Q, Dai F, Hills A, Franks PJ, et al** (2017) Evolutionary Conservation of ABA Signaling for Stomatal Closure. *Plant Physiol* **174**: 732–747
- Caine RS, Chater CC, Kamisugi Y, Cuming AC, Beerling DJ, Gray JE, Fleming AJ** (2016) An ancestral stomatal patterning module revealed in the non-vascular land plant *Physcomitrella patens*. *Development* **143**: 3306–3314
- Chater CCC, Caine RS, Fleming AJ, Gray JE** (2017) Origins and Evolution of Stomatal Development. *Plant Physiol* **174**: 624–638



- Clark JW, Puttick MN, Donoghue PCJ** (2019) Origin of horsetails and the role of whole-genome duplication in plant macroevolution. *P Roy Soc B-Biol Sci* **286**: 20191662
- Cominelli E, Galbiati M, Tonelli C** (2010) Transcription factors controlling stomatal movements and drought tolerance. *Biochem Soc Symp* **1**: 41–45
- Cotelle V, Leonhardt N** (2019) Chapter Four - ABA signaling in guard cells1. *In* M Seo, A Marion-Poll, eds, *Adv Bot Res*. Academic Press, pp 115–170
- Cullen E, Rudall PJ** (2016) The remarkable stomata of horsetails (*Equisetum*): patterning, ultrastructure and development. *Ann Bot* **118**: 207–218
- Cutler null, Krochko null** (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci* **4**: 472–478
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Absciscic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–679
- Dayanandan P, Kaufman PB** (1973) Stomata in *Equisetum*. *Can J Bot* **51**: 1555–1564
- Dejonghe W, Cutler SR** (2019) Chapter Ten - Absciscic acid as a gateway for the crops of tomorrow. *In* M Seo, A Marion-Poll, eds, *Advances in Botanical Research*. Academic Press, pp 341–370
- Dittrich M, Mueller HM, Bauer H, Peirats-Llobet M, Rodriguez PL, Geilfus C-M, Carpentier SC, Al Rasheid KAS, Kollist H, Merilo E, et al** (2019) The role of Arabidopsis ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nat Plants* **5**: 1002–1011
- Dosdall L** (1919) Water requirement and adaptation in *Equisetum* (Continued). *The Plant World* **22**: 29–44
- Ekpa O, Palacios-Rojas N, Kruseman G, Fogliano V, Linnemann AR** (2019) Sub-Saharan African Maize-Based Foods - Processing Practices, Challenges and Opportunities. *Food Rev Int* **35**: 609–639
- Elgorriaga A, Escapa IH, Rothwell GW, Tomescu AMF, Cúneo NR** (2018) Origin of *Equisetum*: Evolution of horsetails (*Equisetales*) within the major euphyllophyte clade *Sphenopsida*. *Am J Bot* **105**: 1286–1303
- Finkelstein R** (2013) Absciscic Acid Synthesis and Response. *Arabidopsis Book*.
- Forster BP** (2001) Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica* **120**: 317–328
- Franks PJ, Britton-Harper ZJ** (2016) No evidence of general CO<sub>2</sub> insensitivity in ferns: one stomatal control mechanism for all land plants? *New Phytol* **211**: 819–827
- Franks PJ, Farquhar GD** (2007) The Mechanical Diversity of Stomata and Its Significance in Gas-Exchange Control. *Plant Physiol* **143**: 78–87

- Geiger D, Maierhofer T, AL-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, et al** (2011) Stomatal Closure by Fast Abscissic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**: ra32
- Giraldo P, Benavente E, Manzano-Agugliaro F, Gimenez E** (2019) Worldwide Research Trends on Wheat and Barley: A Bibliometric Comparative Analysis. *Agronomy* **9**: 352
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernández MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, et al** (2012) Arabidopsis PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscissic Acid. *Plant Cell* **24**: 2483–2496
- Gowik U, Westhoff P** (2011) The Path from C3 to C4 Photosynthesis. *Plant Physiology* **155**: 56–63
- Gürel F, Öztürk ZN, Uçarlı C, Rosellini D** (2016) Barley Genes as Tools to Confer Abiotic Stress Tolerance in Crops. *Front Plant Sci* **7**: 1137.
- Hamim** (2005) Photosynthesis of C3 and C4 Species in Response to Increased CO2 Concentration and Drought Stress. *HAYATI Journal of Biosciences* **12**: 131–138
- Harwood WA** (2019) An Introduction to Barley: The Crop and the Model. *In* WA Harwood, ed, *Barley: Methods and Protocols*. Springer, New York, pp 1–5
- He Z, Wu J, Sun X, Dai M** (2019) The Maize Clade A PP2C Phosphatases Play Critical Roles in Multiple Abiotic Stress Responses. *Int J Mol Sci* **14**: 3573.
- Holmes M** (2018) Crops in a machine:: industrialising barley breeding in twentieth-century Britain. *In* J Agar, J Ward, eds, *Histories of Technology, the Environment and Modern Britain*. UCL Press, pp 142–160
- Hörak H, Kollist H, Merilo E** (2017) Fern Stomatal Responses to ABA and CO2 Depend on Species and Growth Conditions. *Plant Physiol* **174**: 672–679
- Hörak H, Sierla M, Töldsepp K, Wang C, Wang Y-S, Nuhkat M, Valk E, Pechter P, Merilo E, Salojärvi J, et al** (2016) A Dominant Mutation in the HT1 Kinase Uncovers Roles of MAP Kinases and GHR1 in CO2-Induced Stomatal Closure. *Plant Cell* **28**: 2493–2509
- Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI** (2010) Carbonic Anhydrases are Upstream Regulators in Guard Cells of CO2-Controlled Stomatal Movements. *Nat Cell Biol* **12**: 87–18
- Husby C** (2013) Biology and Functional Ecology of Equisetum with Emphasis on the Giant Horsetails. *Bot Rev* **79**: 147–177
- Husby CE, Delatorre-Herrera J, Oberbauer SF, Grau A, Novara L** (2014) Stomatal conductance patterns of Equisetum giganteum stems in response to environmental factors in South America. *Botany* **92**: 701–712

- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC)** (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* **345**: 1251788
- Ishizaki K, Mizutani M, Shimamura M, Masuda A, Nishihama R, Kohchi T** (2013) Essential Role of the E3 Ubiquitin Ligase NOPPERABO1 in Schizogenous Intercellular Space Formation in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell* **25**: 4075–4084
- Jalakas P** (2019) Unravelling signalling pathways contributing to stomatal conductance and responsiveness. Thesis. DSpace. University of Tartu
- Jalakas P, Merilo E, Kollist H, Brosché M** (2018) ABA-mediated regulation of stomatal density is OST1-independent. *Plant Direct* **9**: e00082.
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J** (2011) Absciscic Acid Signal off the STARTing Block. *Mol Plant* **4**: 562–580
- Kamboj A, Ziemann M, Bhawe M** (2014) Identification of salt-tolerant barley varieties by a consolidated physiological and molecular approach. *Acta Physiol Plant* **37**: 1716
- Kang J, Hwang J-U, Lee M, Kim Y-Y, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y** (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2355–2360
- Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI** (2010) Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Absciscic Acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 561–591
- Kirkham MB** (2014) Chapter 24 - Stomatal Anatomy and Stomatal Resistance. *In* MB Kirkham, ed, *Principles of Soil and Plant Water Relations* (Second Edition). Academic Press, Boston, pp 431–451
- Koers S, Guzel-Deger A, Marten I, Roelfsema MRG** (2011) Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. *The Plant J* **68**: 670–680
- Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MRG** (2014) Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytol* **203**: 44–62
- Kriedemann PE, Loveys BR, Fuller GL, Leopold AC** (1972) Absciscic Acid and Stomatal Regulation 1. *Plant Physiol* **49**: 842–847
- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K** (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2361–2366
- Kuromori T, Seo M, Shinozaki K** (2018) ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends Plant Sci* **23**: 513–522
- Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K** (2014) Intertissue Signal Transfer of Absciscic Acid from Vascular Cells to Guard Cells. *Plant Physiol* **164**: 1587–1592

- Larqu -Saavedra A, Wain RL** (1976) Studies on plant growth-regulating substances. XLII. Absciscic acid as a genetic character related to drought tolerance. *Ann Appl Biol* **83**: 291–297
- Leng G, Hall J** (2019) Crop yield sensitivity of global major agricultural countries to droughts and the projected changes in the future. *Sci Total Environ* **654**: 811–821
- Li J, Wu Y, Xie Q, Gong Z** (2017) 5 - Absciscic acid. *In* J Li, C Li, SM Smith, eds, *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Academic Press, pp 161–202
- Lind C, Dreyer I, López-Sanjurjo EJ, von Meyer K, Ishizaki K, Kohchi T, Lang D, Zhao Y, Kreuzer I, Al-Rasheid KAS, et al** (2015) Stomatal Guard Cells Co-opted an Ancient ABA-Dependent Desiccation Survival System to Regulate Stomatal Closure. *Curr Biol* **25**: 928–935
- Long** (1998) Chapter 7. Environmental responses. *In* RF Sage, RK Monson, eds, *C4 Plant Biology*. Elsevier, pp 215–249
- López-Castañeda C, Richards RA** (1994a) Variation in temperate cereals in rainfed environments I. Grain yield, biomass and agronomic characteristics. *Field Crop Res* **37**: 51–62
- López-Castañeda C, Richards RA** (1994b) Variation in temperate cereals in rainfed environments II. Phasic development and growth. *Field Crop Res* **37**: 63–75
- Ma Y, Cao J, He J, Chen Q, Li X, Yang Y** (2018) Molecular Mechanism for the Regulation of ABA Homeostasis During Plant Development and Stress Responses. *Int J Mol Sci* **11**: 3643
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E** (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Absciscic Acid Sensors. *Science* **324**: 1064–1068
- Mackay I, Horwell A, Garner J, White J, McKee J, Philpott H** (2011) Reanalyses of the historical series of UK variety trials to quantify the contributions of genetic and environmental factors to trends and variability in yield over time. *Theor Appl Genet* **122**: 225–238
- Marom Z, Shtein I, Bar-On B** (2017) Stomatal Opening: The Role of Cell-Wall Mechanical Anisotropy and Its Analytical Relations to the Bio-composite Characteristics. *Front Plant Sci* **8**: 2061.
- McAdam SAM, Brodribb TJ** (2018) Mesophyll Cells Are the Main Site of Absciscic Acid Biosynthesis in Water-Stressed Leaves. *Plant Physiol* **177**: 911–917
- McAdam SAM, Brodribb TJ** (2012) Fern and Lycophyte Guard Cells Do Not Respond to Endogenous Absciscic Acid. *Plant Cell* **24**: 1510–1521
- McAdam SAM, Susmilch FC** (2020) The evolving role of absciscic acid in cell function and plant development over geological time. *Semin Cell Dev Bio*. doi:10.1016/j.semcdb.2020.06.006

- Mega R, Abe F, Kim J-S, Tsuboi Y, Tanaka K, Kobayashi H, Sakata Y, Hanada K, Tsujimoto H, Kikuchi J, et al** (2019) Tuning water-use efficiency and drought tolerance in wheat using abscisic acid receptors. *Nat Plants* **5**: 153–159
- Meigas E** (2017) Nisu ja maisi õhulõhede juhtivuse, regulatsiooni ning fotosünteesi võrdlev analüüs. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool
- Merilo E, Jalakas P, Kollist H, Brosché M** (2015) The Role of ABA Recycling and Transporter Proteins in Rapid Stomatal Responses to Reduced Air Humidity, Elevated CO<sub>2</sub>, and Exogenous ABA. *Mol Plant* **8**: 657–659
- Merilo E, Jõesaar I, Brosché M, Kollist H** (2014) To open or to close: species-specific stomatal responses to simultaneously applied opposing environmental factors. *New Phytol* **202**: 499–508
- Merilo E, Yarmolinsky D, Jalakas P, Parik H, Tulva I, Rasulov B, Kilk K, Kollist H** (2018) Stomatal VPD Response: There Is More to the Story Than ABA. *Plant Physiol* **176**: 851–864
- Merryweather J** (2020) Horsetails. In J Merryweather Britain's Ferns: A Field Guide to the Clubmosses, Quillworts, Horsetails and Ferns of Great Britain and Ireland. Princeton University Press. pp. 52-57
- Michael W** (2016) The development of horsetails in the Mesozoic. In M Wachtler, T Perner Fossil Triassic Plants from Europe and their evolution. Volume 2: Lycopods, horsetails, ferns, Edition: First edition. Dolomythos Museum, pp 58–87
- Moore F, Lobell D** (2014) Adaptation potential of European agriculture in response to climate change. *Nat Clim Change* **4**: 614
- Moore F, Lobell D** (2015) The Fingerprint of Climate Trends on European Crop Yields. *PNAS* **9**: 2670-2675.
- Mulholland BJ, Black CR, Taylor IB, Roberts JA** (1999) Influence of Soil Compaction on Xylem Sap Composition in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol* **155**: 503–508
- Munemasa S, Hauser F, Park J, Waadt R, Brandt B, Schroeder JI** (2015) Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr Opin Plant Biol* **28**: 154–162
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165–185
- Newton A, Flavell A, George T, Leat P, Mullholland B, Ramsay L, Revoredo-Giha C, Russell J, Steffenson B, Swanston J, et al** (2011) Crops that feed the world 4. Barley: A resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Secur* **3**: 141–178
- Nunes TDG, Zhang D, Raissig MT** (2020) Form, development and function of grass stomata. *Plant J* **101**: 780–799
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow T-FF, et al** (2009) Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**: 1068–1071

- Piperno DR, Flannery KV** (2001) The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. *PNAS* **98**: 2101–2103
- Prasanna BM** (2013) Maize in the Developing World: Trends, Challenges, and Opportunities. CIMMYT
- Prohens J** (2011) Plant Breeding: A Success Story to be Continued Thanks to the Advances in Genomics. *Front Plant Sci* **2**: 51
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E** (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* **15**: 395–401
- Ranum P, Peña-Rosas JP, Garcia-Casal MN** (2014) Global maize production, utilization, and consumption. *Ann N Y Acad Sci* **1312**: 105–112
- Raschke K, Hanebuth WF, Farquhar GD** (1978) Relationship between stomatal conductance and light intensity in leaves of *Zea mays* L., derived from experiments using the mesophyll as shade. *Planta* **139**: 73–77
- Reichle DE** (2020) Chapter 4 - Biological energy transformations by plants. *In* DE Reichle, ed, *The Global Carbon Cycle and Climate Change*. Elsevier, pp 43–53
- Ruszcza EM, Beerling DJ, Franks PJ, Chater C, Casson SA, Gray JE, Hetherington AM** (2011) Land Plants Acquired Active Stomatal Control Early in Their Evolutionary History. *Curr Biol* **21**: 1030–1035
- Saade S, Negrão S, Plett D, Garnett T, Tester M** (2018) Genomic and Genetic Studies of Abiotic Stress Tolerance in Barley. *In* N Stein, GJ Muehlbauer, eds, *The Barley Genome*. Springer International Publishing, Cham, pp 259–286
- Sage RF, Zhu X-G** (2011) Exploiting the engine of C4 photosynthesis. *J Exp Bot* **62**: 2989–3000
- Schäfer N, Maierhofer T, Herrmann J, Jørgensen M, Lind C, Meyer K, Lautner S, Fromm J, Felder M, Hetherington A, et al** (2018) A Tandem Amino Acid Residue Motif in Guard Cell SLAC1 Anion Channel of Grasses Allows for the Control of Stomatal Aperture by Nitrate. *Curr Biol* **9**: 1370–1379
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T** (2007) Light Regulation of Stomatal Movement. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 219–247
- Staniforth RJ** (2013) Horsetails and Scouring-Rushes (*Equisetum* Spp.) in Manitoba. *Blue Jay* **71**: 48–67
- Sun Y, Harpazi B, Wijerathna-Yapa A, Merilo E, Vries J de, Michaeli D, Gal M, Cuming AC, Kollist H, Mosquna A** (2019) A ligand-independent origin of abscisic acid perception. *PNAS* **116**: 24892–24899
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S** (2005) Ethylene Inhibits Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138**: 2337–2343

- Tao F, Palosuo T, Rötter RP, Díaz-Ambrona CGH, Inés Mínguez M, Semenov MA, Kersebaum KC, Cammarano D, Specka X, Nendel C, et al** (2020) Why do crop models diverge substantially in climate impact projections? A comprehensive analysis based on eight barley crop models. *Agr Forest Meteorol* **281**: 107851
- Töldsepp K, Zhang J, Takahashi Y, Sindarovska Y, Hõrak H, Ceciliato PHO, Koolmeister K, Wang Y-S, Vaahtera L, Jakobson L, et al** (2018) Mitogen-activated protein kinases MPK4 and MPK12 are key components mediating CO<sub>2</sub>-induced stomatal movements. *Plant J* **96**: 1018–1035
- Tomescu AMF, Escapa IH, Rothwell GW, Elgorriaga A, Cúneo NR** (2017) Developmental programmes in the evolution of Equisetum reproductive morphology: a hierarchical modularity hypothesis. *Ann Bot* **119**: 489–505
- Vaidya AS, Helander JDM, Peterson FC, Elzinga D, Dejonghe W, Kaundal A, Park S-Y, Xing Z, Mega R, Takeuchi J, et al** (2019) Dynamic control of plant water use using designed ABA receptor agonists. *Science* **366**: 6464
- Vanneste K, Sterck L, Myburg AA, Van de Peer Y, Mizrachi E** (2015) Horsetails Are Ancient Polyploids: Evidence from Equisetum giganteum. *Plant Cell* **27**: 1567–1578
- de Vries J, Curtis BA, Gould SB, Archibald JM** (2018) Embryophyte stress signaling evolved in the algal progenitors of land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 3471–3480
- Wang X, Chen Z-H, Yang C, Zhang X, Jin G, Chen G, Wang Y, Holford P, Nevo E, Zhang G, et al** (2018) Genomic adaptation to drought in wild barley is driven by edaphic natural selection at the Tabigha Evolution Slope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 5223–5228
- Way DA, Katul GG, Manzoni S, Vico G** (2014) Increasing water use efficiency along the C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> evolutionary pathway: a stomatal optimization perspective. *J Exp Bot* **65**: 3683–3693
- Wendelboe-Nelson C, Morris PC** (2012) Proteins linked to drought tolerance revealed by DIGE analysis of drought resistant and susceptible barley varieties. *Proteomics* **12**: 3374–3385
- Wendorf F, Schild R, Hadidi NE, Close AE, Kobusiewicz M, Wieckowska H, Issawi B, Haas H** (1979) Use of Barley in the Egyptian Late Paleolithic. *Science* **205**: 1341–1347
- Wendt T, Holme I, Dockter C, Preuß A, Thomas W, Druka A, Waugh R, Hansson M, Braumann I** (2016) HvDep1 Is a Positive Regulator of Culm Elongation and Grain Size in Barley and Impacts Yield in an Environment-Dependent Manner. *PLOS ONE* **11**: e0168924
- Xiang Y, Sun X, Gao S, Qin F, Dai M** (2017) Deletion of an Endoplasmic Reticulum Stress Response Element in a ZmPP2C-A Gene Facilitates Drought Tolerance of Maize Seedlings. *Mol Plant* **10**: 456–469
- Xie W, Xiong W, Pan J, Ali T, Cui Q, Guan D, Meng J, Mueller ND, Lin E, Davis SJ** (2018) Decreases in global beer supply due to extreme drought and heat. *Nat Plants* **4**: 964–973

- Xu Z-Y, Lee KH, Dong T, Jeong JC, Jin JB, Kanno Y, Kim DH, Kim SY, Seo M, Bressan RA, et al** (2012) A Vacuolar  $\beta$ -Glucosidase Homolog That Possesses Glucose-Conjugated Abscissic Acid Hydrolyzing Activity Plays an Important Role in Osmotic Stress Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 2184–2199
- Zhang L, Takahashi Y, Hsu P-K, Kollist H, Merilo E, Krysan PJ, Schroeder JI** (2020) FRET kinase sensor development reveals SnRK2/OST1 activation by ABA but not by MeJA and high CO<sub>2</sub> during stomatal closure. *eLife* **9**: 56351
- Zhang M, Jin Z-Q, Zhao J, Zhang G, Wu F** (2015) Physiological and biochemical responses to drought stress in cultivated and Tibetan wild barley. *Plant Growth Regul* **75**: 567–574
- Zhou MX** (2010) Barley Production and Consumption. *In* G Zhang, C Li, eds, Genetics and Improvement of Barley Malt Quality. Springer, pp 1–17

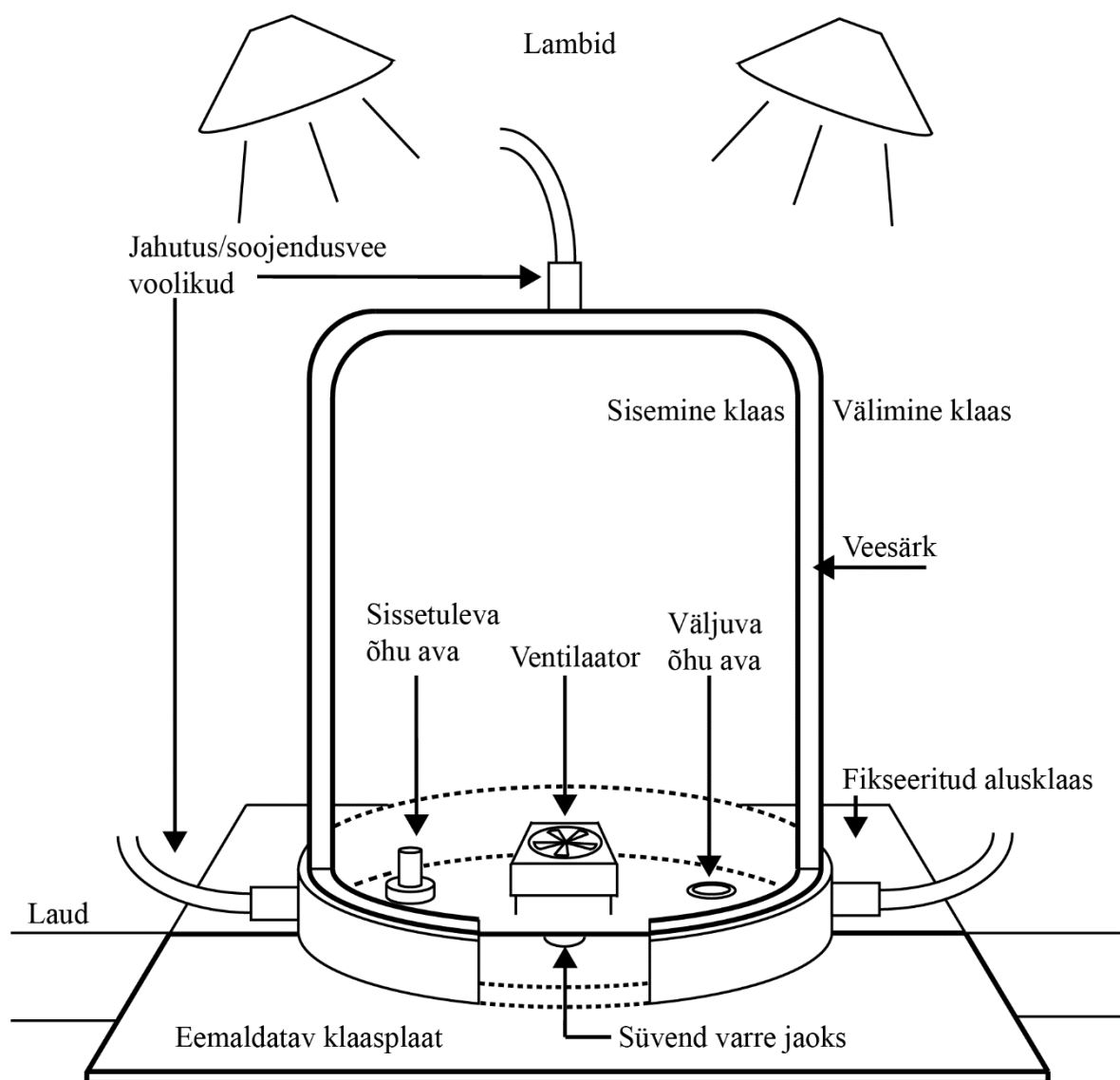
## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> - **FAOSTAT** - külastatud 20.05.2020

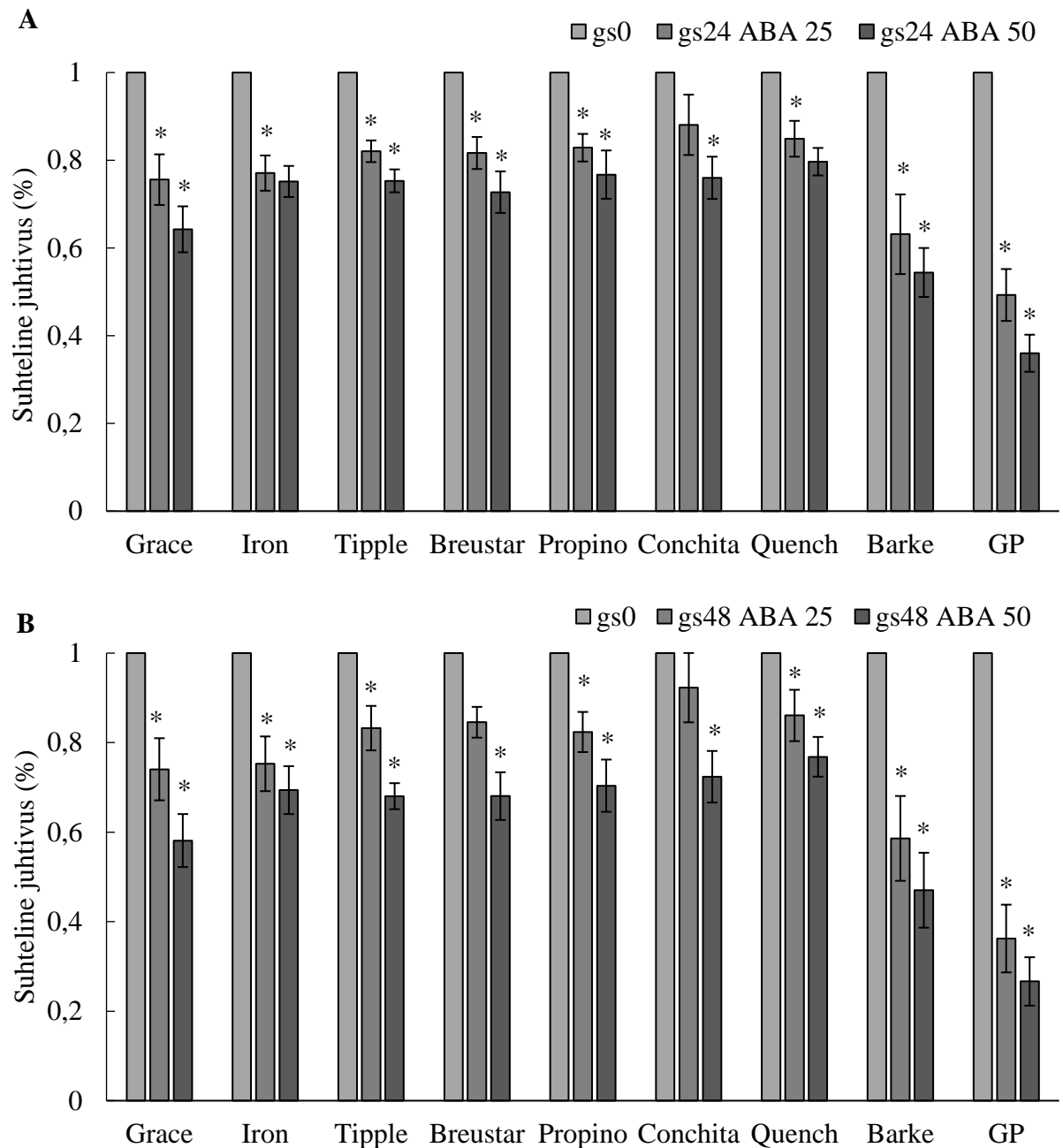
<https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-2015-revision.html> - **UN DESA** - külastatud 22.05.2020



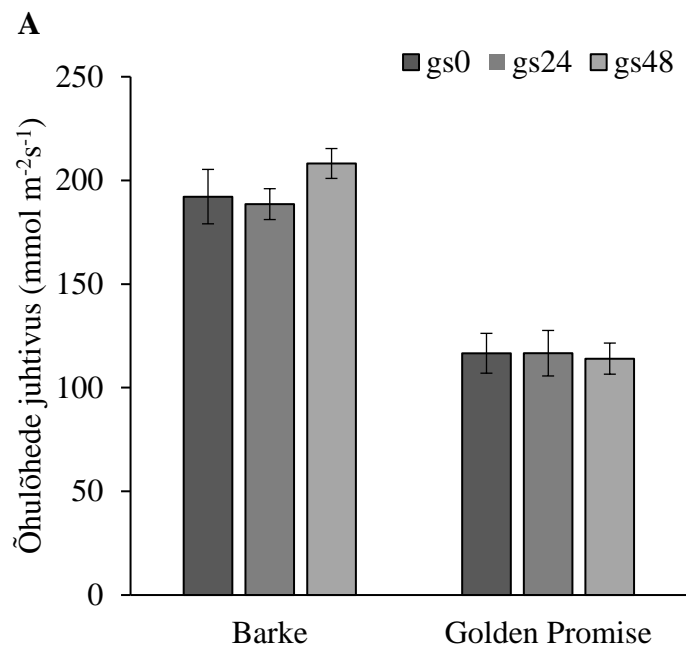
## LISAD



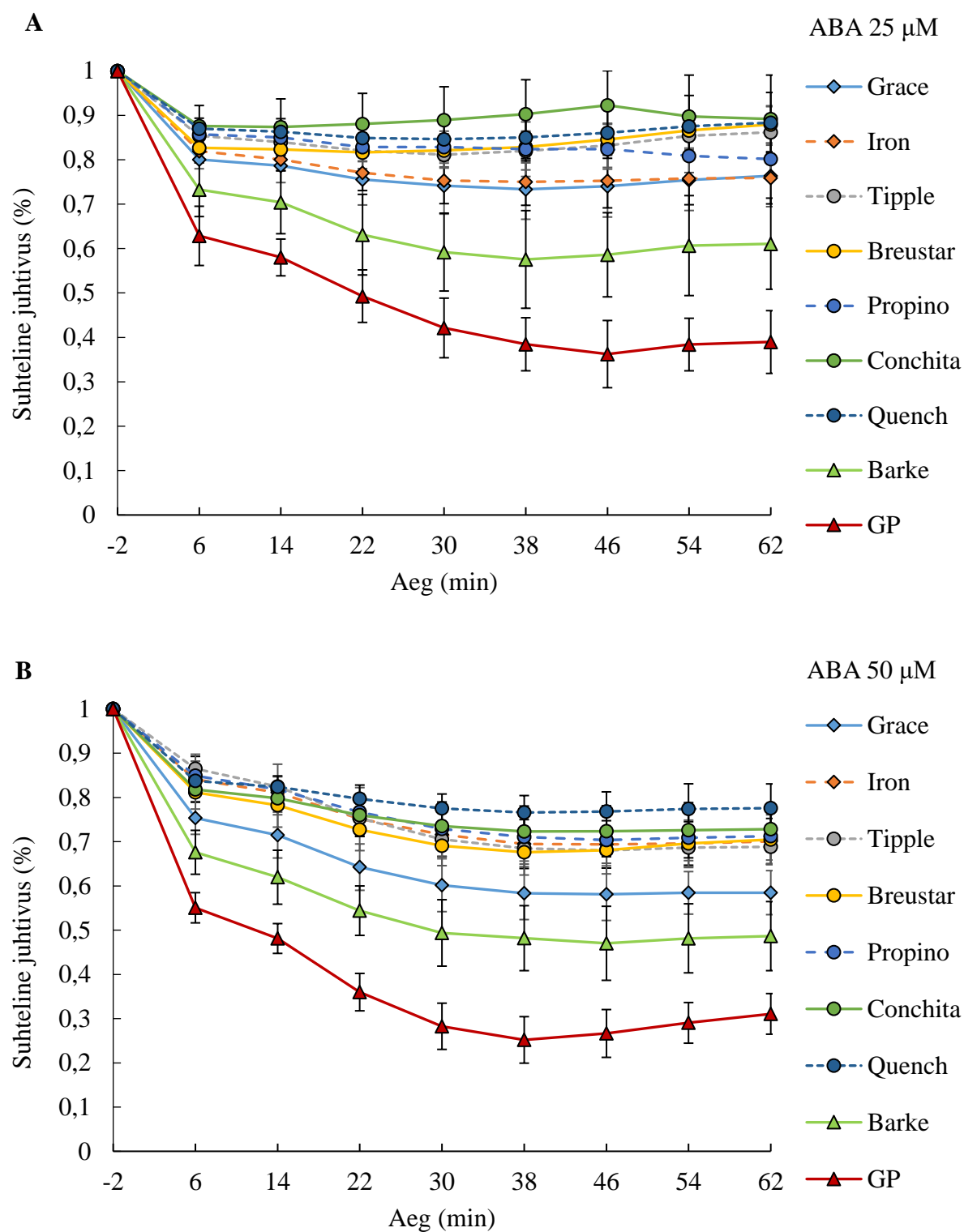
Lisa 1. Illustratsioon gaasivahetussüsteemi ühest mõõtekambrist (Meigas, bakalaureusetöö, 2017).  
Mõõtekambri komponendid on joonisel näidatud.



Lisa 2. Odra sortide suhtelised juhtivused 25 ja 50  $\mu\text{M}$  ABA võrdluses 24 minutit (**A**) ja 48 minutit (**B**) peale 25 ja 50  $\mu\text{M}$  ABA-ga pritsimist esialgse juhtivuse (gs0) suhtes. Statistiliselt olulised erinevused antud sordi gs0 ja gs24 või gs48 vahel on tähistatud tärniga (\*), mis saadi, kasutades korduvmõõtmistega ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey HSD testi. n=4-8



Lisa 3. Odrasortide Barke ja Golden Promise õhulõhede juhtivused (keskmine  $\pm$  standardviga) enne, 24 ja 48 minutit pärast kontroll-lahusega (destilleeritud vesi; 0,05% etanool; 0,012% Silwet L-77) pritsimist. Statistiliselt olulisi erinevusi sordi sees gs0 väärtusega võrreldes ei esinenud (korduvmõõtmistega ANOVA). n=3-5



Lisa 4. Odra sortide suhteliste juhtivuste (keskmine  $\pm$  standardviga) ajaline käik ühe tunni jooksul peale 25  $\mu$ M (**A**) ja 50  $\mu$ M (**B**) abstsiihappega pritsimist ajahetkel 0. (**A**)  $n=4-8$ ; (**B**)  $n=4-5$

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Egon Meigas,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose ABA-toimeline õhulõhede regulatsioon teraviljadel ja osjadel mille juhendaja on Ebe Merilo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Egon Meigas*

**11.08.2020**